

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6479777号
(P6479777)

(45) 発行日 平成31年3月6日(2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)
 C O 7 K 14/46 (2006.01)
 A 6 1 K 47/50 (2017.01)
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A
 C O 7 K 14/46
 A 6 1 K 47/50
 A 6 1 K 38/16
 A 6 1 P 27/02

請求項の数 7 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-518595 (P2016-518595)
 (86) (22) 出願日 平成26年6月11日(2014.6.11)
 (65) 公表番号 特表2016-527199 (P2016-527199A)
 (43) 公表日 平成28年9月8日(2016.9.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2014/002029
 (87) 国際公開番号 W02015/025217
 (87) 国際公開日 平成27年2月26日(2015.2.26)
 審査請求日 平成29年6月9日(2017.6.9)
 (31) 優先権主張番号 61/833,819
 (32) 優先日 平成25年6月11日(2013.6.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 515343384
 ボルタゲ ファーマシューティカルス エ
 ルティーディー.
 英国領バージン諸島 アイエム1 2エー
 エイチ アイル オブ マン ダグラス
 ネルソン ストリート バイキング ハウ
 ス
 (73) 特許権者 515343395
 ブルース エイチ. リットマン
 アメリカ合衆国 コネチカット州 O 6 3
 7 8 ストニングトン プレンティス ウ
 イリアムス ロード 2 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的に活性な特異的カーゴペプチドと結合したヒト由来の細胞透過性ペプチドの構造、製造および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 2 のポリペプチド配列からなる、細胞膜透過性ペプチド複合体。

【請求項 2】

前記細胞膜透過性ペプチドが、細胞内標的および／または核内標的と相互作用する、請求項 1 に記載の細胞膜透過性ペプチド複合体。

【請求項 3】

前記細胞膜透過性ペプチドと前記細胞内標的および／または前記核内標的との相互作用が、NF-κB 活性化、および／またはぶどう膜炎に影響を与える、請求項 2 に記載の細胞膜透過性ペプチド複合体。

【請求項 4】

前記配列の開始因子メチオニン残基は、活性剤および／または治療剤として使用する前に除去される、請求項 1 に記載の細胞膜透過性ペプチド複合体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の細胞膜透過性ペプチド複合体を含む、組成物。

【請求項 6】

前記組成物が、吸入可能な組成物、局所用または注射用の点眼製剤他の眼用組成物、浣腸剤、外用組成物、または持続的放出のための注射可能なインプラントを含む注射可能な組成物の形態である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

10

20

ドライアイまたは他の炎症性眼状態の治療に使用するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞膜透過性ペプチド複合体、または請求項5もしくは6に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本明細書にはA S C I I形式で電子的に提出した配列表が含まれており、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。2015年9月16日作成のかかるアスキーファイルのコピーファイル名は89352-8002.W000_SL.txtであり、サイズは180,964バイトである。

10

本明細書に開示する実施形態は、一般に、細胞透過性ペプチド複合体を投与することによってさまざまな状態または疾患を治療するための組成物および方法に関し、特に、限定されるわけではないが非限定的に、その形態が、ヒトホメオボックス（H O X）遺伝子および細胞透過化特性を備えるホメオドメインを含有する他のヒト遺伝子によりコードされるホメオドメインのアミノ酸配列に由来するペプチドを使用した、融合タンパク質またはタンパク質／核酸複合体であることに関する。より詳細には、諸実施形態は、1以上の機能性もしくは調節性のペプチドまたはタンパク質に連結された、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部を含む送達系に関する。これらのペプチドにより、組織、細胞および細胞の核への侵入が促進されるため、生物学的に活性な第2の領域、すなわち「カーゴ（積み荷）」を含んだ融合タンパク質または複合体を治療のための作用部位に到達させることができる。

20

【背景技術】

【0002】

遺伝子機能の異常または機能低下による症状を呈する疾患では、遺伝子は、核酸、ペプチドおよびタンパク質などの生物学的活性分子がそれらの細胞内および核内での作用部位に直接送達されることで制御されて、転写、翻訳または転写因子の産生と作用への直接または間接的な干渉を介して遺伝子発現に影響を与えており、また、欠失または欠陥のあるタンパク質は置換され、上記の生物学的活性分子が生殖細胞系列変異または体細胞変異を有する個体に提供される。遺伝的に欠損のある個体では、こうした生物学的に重要なタンパク質の直接置換は、（i）これらのタンパク質が、通常の機能場所である中枢神経系（C N S）などの細胞内部位および組織部位に到達することができないこと、および（i i）これらのタンパク質の免疫原性が障害となっている。

30

【発明の概要】

【0003】

本明細書に開示する実施形態および修正範囲は、融合タンパク質などの複合体のための組成物、およびそれらを使用してさまざまな状態を治療する方法を提供する。かかる複合体または融合タンパク質には、ヒトH O X遺伝子に由来する60のアミノ酸からなる配列もしくは多様体、またはヒトホメオドメインもしくは多様体もしくはその一部と非人工的には会合していない、他のヒトホメオドメイン配列もしくは多様体もしくはその一部が組み込まれ、複合体の暴露および／または有効性を低下させる、または臨床有害事象を引き起こすような望ましくない免疫応答を誘発せずに、機能性および調節性の分子を、細胞膜および核膜を通過して意図される作用部位へ移行させる。さらに、このような複合体および融合タンパク質は、血液脳関門通過の促進によるC N Sへの侵入、およびそれに続くミクログリアおよび神経細胞などのC N S細胞への侵入も可能にするとともに、これらの機能性または調節性の分子が、細胞質内および核内の標的に結合できるようにもする。（i）対象遺伝子の発現産物または（i i）遺伝子機能を制御できる新規な分子を直接細胞内に送達できることから、医療分野での応用範囲は広い。

40

【0004】

生物学的活性分子を局所（外用）および全身の細胞内および核内の標的に送達しやすくするほか、ヒトH O X遺伝子由来のペプチド配列により血液脳関門を通過する輸送も促進

50

されるため、これらのH O X 遺伝子配列を含有する分子に対してC N S 細胞内が暴露される。現在の薬物送達の障害（血液脳関門などの）を通過して治療薬を送達するこの技術用途を開発すれば、全身投与でも薬物を血液脳関門を通過させて送達し中枢神経系の癌を標的にすることが可能である。このような用途例が、アドリマイシン、ドキソルビシンまたはH e r 2 などの癌細胞を標的とするモノクローナル抗体（例えば、トラスツズマブ）と結合した、脳転移H E R 2 陽性乳癌を治療するためのH O X 遺伝子由来ペプチドである。さらに、普通ではC N S 中濃度が治療的レベルに達しない抗菌薬および抗ウイルス薬でも、血液脳関門を通過して入り込むことができるため、動物モデルにおいて細胞内および細胞外の細菌性およびウイルス性C N S 感染の治療を成功させることができる。

【0005】

10

ある実施形態では、複合体は、配列番号1～19のいずれかに記載の配列または多様体またはその一部を有し、かかる第1の領域と非人工的には会合していない第2の領域に結合している第1の領域を含み、これにおいて、第2の領域は、配列番号20、23、26、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、および72のいずれか1つに記載の配列を有するポリペプチド、または多様体、または多様体もしくはその一部である。ある実施形態では、第1の領域はヒト遺伝子由来である。

【0006】

ある実施形態では、複合体は、

(a) H O X C 1 2 およびH O X D 1 2 のどちらか1つのH O X 遺伝子の、アミノ酸60個からなるドメインまたはその多様性部分を含む第1の領域、および

20

(b) かかる第1の領域に非人工的には会合していない第2の領域を含み、ここで、少なくとも第1の領域は非変性である。

【0007】

ある実施形態によると、第2の領域は核酸を含んでよい。これは、アジド基とアルキン基間の「クリック反応」として知られる、特異的なH u i s g e n の1,3-双極子付加環化反応を介した会合であってよく、ペプチド-オリゴヌクレオチド複合体の合成に利用される。あるいは、この実施形態は、第2の領域が、複合体部分として核酸を結合できる核酸結合ドメインを含み得る、タンパク質／核酸複合体として見られる場合がある。

【0008】

30

別の実施形態によれば、第1および第2の領域は、特異的なH u i s g e n の1,3-双極子付加環化反応（すなわち、「クリック反応」）を介して会合し、これにおいて、オリゴヌクレオチドは、遺伝子発現に影響を与えるためにm i R N A またはm i R N A の拮抗因子として作用する。これらのオリゴヌクレオチドは、D N A、R N A、L N A（locked nucleic acid：ロックド核酸）、P N A（peptide nucleic acid：ペプチド核酸）または他の核酸を含んでよい。

【0009】

さらなる実施形態によれば、第1および第2の領域は、核酸塩基がホスホジエステル骨格ではなく、むしろペプチド骨格に結合している、標準的ペプチド結合を介して結合している。これらの核酸塩基の一部またはすべては、細胞内の他の核酸とハイブリダイズして遺伝子発現に影響を与えることができる。これらの核酸塩基は、P N A、 γ P N A であるかまたは同様の特性を有する他の側鎖を含んでよい。

40

【0010】

さらに別の実施形態では、ペプチドまたはペプチド-核酸複合体を使用してm i R N A の活性に影響を与えることができ、例えば、m i R N A -132を拮抗してR a s 経路および癌を阻害すること、m i R -21を拮抗して癌またはN F - κ B 経路および炎症を阻害すること、または健康状態に有害なおよび／または望ましくない影響を及ぼし得る、他のm i R N A の機能および経路へ影響を与えることが含まれるが、これらに限定されない。

【0011】

さらなる実施形態によれば、複合体は融合タンパク質の形態である。この実施形態では

50

、第2の領域は機能性または調節性タンパク質である。

【0012】

別の実施形態では、複合体は、

(a) 細胞透過化能力を有するヒトホメオドメインを含む第1の領域と、

(b) これを連結して、かかる第1の領域に非人工的には会合していない、機能酵素などのタンパク質を含む第2の領域とを含むことができる。

【0013】

別の実施形態では、組成物は、複合体または融合タンパク質を含み、これらは、吸入可能な組成物；局所用または注射用の点眼などの眼用組成物；浣腸；外用組成物；または持続的に放出させるための注射可能なインプラントを含む注射可能な組成物、の任意の形態を取り得る。

10

【0014】

別の開示実施形態は、1以上の生物学的に活性なペプチドまたはタンパク質を含有する複合体または融合タンパク質がCNS細胞に移行できるようにする工程を含む方法である。

【0015】

他の実施形態は、複合体または融合タンパク質として意図される細胞質ゾルまたは核の作用部位へ送達される、他の場合には抗原性となるタンパク質の免疫原性を防ぐ方法を含む。

【0016】

これらおよび他の実施形態を以下に詳細に開示する。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、「カーゴ」ペプチドN末端における60アミノ酸ヒトHOXC12ホメオドメイン（第1の領域）（配列番号1）または多様体またはその一部の一例を示す。

【0018】

【図2】図2は、60アミノ酸ヒトHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部のN末端におけるカーゴペプチド（第2の領域）（配列番号2）の一例を示す。

【0019】

【図3a】図3aは、C末端（配列番号107～108、それぞれ、出現順）に「カーゴ」ペプチド（第2および第3の領域）を有している、60アミノ酸ヒトHOXD12ホメオドメイン（第1の領域）または多様体またはその一部の一例を示し、これにおいて、かかる第3の領域を使用して、特定の組織または細胞種へ向かわせるために構造全体を標的とすることができる。

30

【0020】

【図3b】図3bは、N末端に（配列番号107～108、それぞれ、出現順）「カーゴ」ペプチド（第2および第3の領域）を有している、60アミノ酸ヒトHOXD12ホメオドメイン（第1の領域）または多様体またはその一部の一例を示し、これにおいて、かかる第3の領域を使用して、特定の組織または細胞種へ向けるために構造全体を標的とすることができる。

40

【0021】

【図4】図4は、「カーゴ」ペプチドのN末端（第2の領域）における60アミノ酸ヒトHOXC12ホメオドメイン（第1の領域）または多様体またはその一部（配列番号109～110、それぞれ、出現順）、およびGSリンカー（配列番号111）を介してC末端に結合しているHis尾部の一例を示す。

【0022】

【図5】図5は、NBD「カーゴ」ペプチド（第2の領域）N末端において60アミノ酸ヒトHOXD12ホメオドメイン（第1の領域）または多様体またはその一部（配列番号112および108、それぞれ、出現順）、およびGSリンカー（配列番号111）を介してC末端に結合しているHis尾部の一例を示す。

50

【0023】

【図6】図6は、転移配列SAAを伴う6HISリーダー配列（配列番号80）の後にTEV切断部位（ENLYFQS）（配列番号81）が続いて配列番号21（PPL-002とも呼ぶ）をなす、適切なN末端を有するプラスミドpJ411：129925の配列の一例を示す。図は、DNAおよびタンパク質の完全長配列を、それぞれ、配列番号115および116として開示している。

【0024】

【図7】図7は、転移配列SAAを伴う6HISリーダー配列（配列番号80）の後にTEV切断部位（ENLYFQS）（配列番号81）が続いて配列番号22（PPL-003とも呼ぶ）をなす、適切なN末端を有するプラスミドpJ411：129926の配列の一例を示す。図は、DNAおよびタンパク質の完全長配列を、それぞれ、配列番号115および116として開示している。

10

【0025】

【図8a】図8aは、マウスのRAW264.7細胞におけるNF- κ B活性化阻害を示す（LPSで4時間刺激）。エラーバーは平均標準誤差（SEM）を表す。

【0026】

【図8b】図8bは、ヒト胎児由来腎臓（HEK）293細胞におけるNF- κ B活性化阻害を示す（TNF- α で4時間刺激）。エラーバーは平均標準誤差（SEM）を表す。

【0027】

【図9】図9は、NBDカーゴ含有する細胞透過性ペプチドによる、HEK293NF- κ Bルシフェラーゼレポーター細胞における、TNF- α の刺激によるNF- κ B活性化阻害を示す。図10：NBDカーゴ-含有細胞透過性ペプチドのインビボ活性測定のタイムライン：マウスにペプチドで前処置を行い、リボ多糖（LPS）注射を行い、サイトカインアッセイ用に指定時間に血液試料を採取した。

20

【0028】

【図11a】図11aは、LPS注射およびペプチドまたはデキサメタゾン（Dex）による前処置を行った後のTNF- α 応答を示す。各データポイントはマウス1匹についての値を表す。

【0029】

【図11b】図11bは、LPS注射およびペプチドまたはデキサメタゾン（Dex）による前処置を行った後のIP-10応答を示す。各データポイントはマウス1匹についての値を表す。

30

【0030】

【図12】図12は、LPS注射およびペプチドまたはデキサメタゾン（Dex）による前処置を行った後のIL-10応答を示す。各データポイントはマウス1匹についての値を表す。

【0031】

【図13】図13は、PPL-003を500、1000、および2000マイクログラム投与後の血漿中濃度を示す。

【0032】

【図14】図14は、PPL-003の用量ごとの血漿中C_{max}を示し、C_{max}（30分）時の平均値および中央値を示す。

40

【0033】

図15aおよび15bは、LPS刺激の0、30および60分前に2000マイクログラムのPPL-003で前処置してから行ったLPS投与後2時間のアミロイドAタンパク質（SAA）の応答を示す。図15aにおいてエラーバーは平均標準誤差（SEM）を表し、また、図15bにおいて、データポイントは個々のマウスのものであり、水平ラインは中央値である。

【0034】

【図16a-b】図16aおよび16bは、用量500、1000、および2000マイ

50

クログラムの P P L - 0 0 3 による前処置後の L P S に対するアミロイド A タンパク質 (S A A) の応答を示す。図 1 6 a においてエラーバーは平均標準誤差 (S E M) を表し、また、図 1 6 b において、データポイントは個々のマウスのものであり、水平ラインは中央値である。パーセント値は、ビヒクル / L P S に対する阻害パーセントである。

【 0 0 3 5 】

【図 1 7 a - b】図 1 7 a および 1 7 b は、L P S 刺激の 0、3 0 および 6 0 分前に 2 0 0 0 マイクログラムの P P L - 0 0 3 を投与した後の、I L - 1 0 およびマウス K c の応答をそれぞれ示す。エラーバーは平均標準誤差 (S E M) を表す。

【 0 0 3 6 】

【図 1 8 a - b】図 1 8 a および 1 8 b は、L P S 刺激 0、3 0 および 6 0 分前に 2 0 0 0 マイクログラムの P P L - 0 0 3 または P P L - 0 0 4 を投与した後の、それぞれの G M - C S F 応答阻害を示す。エラーバーは平均標準誤差 (S E M) を表す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 7 】

ヒト H O X 遺伝子および他のホメオドメインをコードする遺伝子は胚発生において重要であり、これらの遺伝子は遺伝子アンテナペディア (A n t p) に相同な配列の短い領域を含んでいるが、ここには、ヒト固有の配列に含まれ、それらの機能を促進するほとんどのアミノ酸が含まれている。アンテナペディアのタンパク質配列は、特異的な D N A の標的配列・因子に結合する、6 0 のアミノ酸からなるモチーフ (ホメオドメイン) の存在を特徴とする。A n t p ホメオドメイン (米国特許第 7, 9 6 8, 5 1 2 号を参照のこと) および A n t p 遺伝子のさらに短い配列は、生物学的に活性な (「カーゴ (積み荷)」) ペプチドが組織および細胞へ侵入して、治療のためのそれらの作用部位まで到達できるよう促進することが示された。

【 0 0 3 8 】

A n t p のホメオドメインおよびより短い領域は、インビトロおよび動物モデルにおいて機能性および調節性タンパク質などのタンパク質を移行させるのに使用することができるが、ヒト H O X 遺伝子および特定の他のヒトホメオドメイン配列に由来のペプチド配列は、ペプチド、タンパク質およびヌクレオチドのような生物学的活性分子の細胞内および核内作用部位への輸送促進も可能で、その際、(i) 複合体の暴露および / または有効性を低下させる、または有害事象を発生させるような、望ましくない免疫応答を誘発することがなく、かつ、(i i) A n t p 複合体および融合タンパク質より有効性が高い。対象遺伝子の発現産物を含めた生物学的活性分子を細胞内に直接送達できることの応用範囲は、特に医療分野において広い。H O X および他のヒトホメオドメインのペプチドは、核酸を移行させることもできる。このことは、遺伝子制御機構を利用する応用に特に有利である。

【 0 0 3 9 】

開示の実施形態およびそれらの修正形態の幾つかは、新規な複合体に関し、これらは融合タンパク質の形態をとってよく、各タンパク質には、ヒト H O X 遺伝子または細胞透過化特性を備えるホメオドメインを含有する他のヒト遺伝子に由来し、第 2 の領域 (2) に連結 (例えば、図 1 に示す 1 2 または 1 3) している、アミノ酸 6 0 個のペプチドまたは多様体またはその一部 (例えば、図 1 に示す 1) と、本明細書に開示する生物学的に活性な「カーゴ (積み荷)」ペプチドの少なくとも 1 つとが含まれる。図 1 は、6 0 アミノ酸ヒト H O X C 1 2 ホメオドメイン (「第 1 の領域」) (1) が、その C 末端 (4) で、生物学的に活性なカーゴペプチド (「第 2 の領域」) (2) の N 末端 (5) に連結していることを含む一実施形態を示す。図 2 は、6 0 アミノ酸ヒト H O X D 1 2 ホメオドメイン (「第 1 の領域」) (1) が、その N 末端 (3) で、生物学的に活性であるカーゴペプチド (「第 2 の領域」) (2) の C 末端 (6) に連結していることを含む別の実施形態を示す。両実施形態における各連結は、単純なペプチド結合 (1 3) または当技術分野で公知のリンカー配列 (1 2) であってよいが、その場合、配列付加により融合タンパク質または複合体の機能が損なわれないこととする。

【0040】

「損なわれる」という用語は、本明細書に記載の任意の転帰について治療有効性を低下させるような、実施形態の複合体の機能低下をいい、例えば、機能が損なわれると、(1) 融合タンパク質の形態をとった複合体、または(2) 別のリンカーを含む複合体で観察される免疫原性低下に比べ、免疫原性低下が弱いものになる可能性がある。

【0041】

「カーゴ」ペプチドには、治療を目的として細胞内へ入る、小さい合成ペプチド、および抗体または抗体の結合領域のようにより大きなタンパク質のいずれも含まれる。(Schutze-Redelmeier M-P et al. "Introduction of exogenous antigens into the MHC class 1 processing and presentation pathway by Drosophila antennapedia homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. J. Immunol. 157(2):650-55, July 15, 1996; M.J. May et al. "Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex" Science 289:1550-54, Sept. 1, 2000; I Strickland and S Ghosh. "Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation" Ann. Rheum. Dis. 65(Suppl 3):iii75-iii82, 2006; C. Avignolo et al. "Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c-Myc protein" FASEB J. 22:1237-45, 2008.)

10

【0042】

「ペプチド(複数可)」、「タンパク質(複数可)」、および「ポリペプチド(複数可)」という用語は、同義で使用される。

20

【0043】

「ヒトホメオドメイン」という用語は、(1) 表3にそれぞれ、配列番号1および配列番号2として示されるHOXC12およびHOXD12配列などのヒトHOX由来のホメオドメインまたは多様体またはそれらの一部; および(2) 配列番号3~19のような、細胞透過化活性を有する他の任意のヒトホメオドメイン、または多様体またはそれらの一部をいう。

【0044】

「非人工的には会合していない」という語句は、複合体または融合タンパク質の全体配列が天然では見られない配列であること、また、かかる全体配列が天然に見られる単一遺伝子でコードされないことを意味する。

30

【0045】

「機能的に連結された」という語句は、第2の領域が細胞膜を移行することができるように第1および第2の領域が連結していることを意味する。このような結合を、「クリック」ケミストリー法または当技術分野で公知の他法の応用により作製してよく、または、ペプチド結合を有する融合タンパク質として領域間に組み込んでもよい。

【0046】

分子生物学/生物学技術分野の当業者であれば、表3および4に示した配列についての多数の変形が、本明細書に開示の実施形態の範囲に入ること理解されるであろう。本明細書で使用する場合、相同性とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が同一である、または同一に近いことをいう。従来技術で理解されているように、コドンの第3塩基の箇所、すなわち、ゆらぎのある塩基で、アミノ酸置換が行われないまま翻訳後ポリペプチド配列中にある、ヌクレオチドのミスマッチが起こり得る。また、遺伝子配列の特定領域におけるヌクレオチドわずかな修正(例えば、置換、挿入または欠失)は、このような修正で変更されたアミノ酸配列が最終遺伝子産物の機能性を変えない配列であればいつでも許容され得る。特定のDNA配列の相同体は、当業者であれば核酸のクロスハイブリダイゼーションをテストする方法をストリンジェンシー条件下で使用して同定することができ、当該技術分野でよく理解されているとおりである(Hames et al., Nucleic Acid Hybridization, (1985) IRL Press, Oxford, UKに記載)。相同性の程度は、比較配列間の同一性パーセンテージで測定されることが多い。

40

【0047】

50

「多様体」という用語は、基準とするポリペプチドまたはタンパク質と異なっているが、本質的な特性を維持しているポリペプチドまたはタンパク質をいう。ポリペプチドの多様体の典型例では、別の基準ポリペプチドとアミノ酸配列が異なっている。一般に、基準ポリペプチドと多様体の配列の違いは、両配列が全体的に酷似し（相同である）、多くの領域において同一となるよう制限される。多様体と基準ポリペプチドは、アミノ酸配列が1以上の修正（例えば、置換、付加、および／または欠失）により異なっていてよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によりコードされるものであっても、されないものであってもよい。ポリペプチドの多様体は、アレル多様体などの非人工的に存在するもの、または非人工的に存在することが知られていない多様体であってよい。

【0048】

10

本開示のポリペプチドおよびタンパク質の構造に修正および変更を行い、なおかつ、かかるポリペプチドと同様の特性を有する分子とすることができる（例えば、保存的アミノ酸置換）。例えば、活性を大きく喪失させずに、配列内の特定のアミノ酸で別のアミノ酸を置換することができる。ポリペプチドまたはタンパク質の生物学的機能活性を定義するのは、そのポリペプチドの相互作用的な能力と性質であることから、ポリペプチドまたはタンパク質配列に特定のアミノ酸配列置換を行い、それでもなお、同様の特性を有するポリペプチドまたはタンパク質を得ることが可能である。

【0049】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換基の相対的類似性、例えば、その疎水性、親水性、荷電、サイズなどに基づいて行われる。上述の特徴を1つまたは複数考慮した例示的置換は当業者に周知であり、それらには、（元の残基：例示的置換）：（Ala：Gly、Ser）、（Arg：Lys）、（Asn：Gln、His）、（Asp：Glu、Cys、Ser）、（Gln：Asn）、（Glu：Asp）、（Gly：Ala）、（His：Asn、Gln）、（Ile：Leu、Val）、（Leu：Ile、Val）、（Lys：Arg）、（Met：Leu、Tyr）、（Ser：Thr）、（Thr：Ser）、（Tyr：Trp、Phe）、および（Val：Ile、Leu）が含まれるが、これらに制限されない。したがって、本開示の実施形態では、機能的または生物学的に同等なポリペプチドまたはタンパク質は、上記に記載したものとみなしている。特に、ポリペプチドおよびタンパク質の実施形態は、対象とするポリペプチドおよびタンパク質に対し、約50%、60%、70%、80%、90%、および95%の配列同一性を有する多様体を含むことができる。

20

30

【0050】

当技術分野で公知の「同一性」とは、2つまたはそれ以上のポリペプチドまたはタンパク質配列を比較して測定した場合のかかる配列間の関係である。当該技術分野では、「同一性」とは、ポリペプチド同士またはタンパク質同士の配列関連性の程度をいい、かかる配列同士の文字列の一致により測定される。「同一性」は、生物情報による公知の方法で容易に計算可能である。

【0051】

第1の領域：開示の複合体または融合タンパク質の実施形態の第1の領域は、例えば、配列番号3～19、または多様体またはそれらの一部のような、HOX C12またはHOX D12遺伝子または細胞透過化活性を有する他の任意のヒトホメオドメインに由来する、非人工的または合成のアミノ酸60個のペプチドまたは多様体またはその一部を含んでよい。

40

【0052】

ある実施形態では、HOX C12（配列番号1）アミノ酸配列は、
SRKKRKPYSKLQLAELEGFLVNEFITRQRRRELSDRLL
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLL
である。

【0053】

別の実施形態では、HOX D12（配列番号2）アミノ酸配列は、

50

ARKKRKP YTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNL
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVV

である。

【0054】

あるいは、他の実施形態には、複合体および融合タンパク質を細胞内および核内に送達できるようにするため、透過化特性を有する、アミノ酸60個のヒトホメオドメイン配列のさらなる17配列のうちいずれか1配列または多様体またはそれらの一部が含まれることになる。さらに、これらの追加配列の各々により、それ以外の配列では血液脳関門を貫通しないであろうと考えられる分子が、CNSへ浸透できるようになる。これらの複合体および融合タンパク質のアミノ酸配列で、第1の領域にHOXC12ホメオドメインを有する配列、およびHOXD12ホメオドメインを有する配列の例を表3に示すが（配列番号21～22、24～25、27～28、31～32、34～35、37～38、40～41、43～44、46～47、49～50、52～53、55～56、58～59、61～62、64～65、67～68、70～71、および73～74、または多様体またはそれらの一部）、他の任意のヒトホメオドメインまたは多様体またはそれらの一部（配列番号3～19）およびこれらの配列の変形をHOXC12ホメオドメインおよびD12ホメオドメインの代わりに用いてよい。各ヒトホメオドメイン配列は、アミノ酸60個のAntp配列に対する同一性が50%未満であるため、構造的には別個の配列であり、固有のヒトの特性を有する。その上、表に示したホメオドメイン配列はすべてヒト由来のもので、ヒトにおいて抗原性になることはない。各ヒトホメオドメイン配列の一覧を、由来するヒト遺伝子名の略語とともに下記表3に示す（配列番号1～19）。カーゴ配列は、それらに意図される機能に応じて、ヒト由来または非ヒト由来のいずれでもよい。

【0055】

さらに、膜を移行させる能力が保持されるのであれば、合成多様体を使用してよい。合成多様体は、一般に、非人工的に存在するタンパク質とは置換、特に保存的置換において異なるであろう。本明細書の「保存的アミノ酸変更」という語句は、アミノ酸群、すなわち疎水性アミノ酸、極性アミノ酸、酸性または塩基性アミノ酸のうち1群の1アミノ酸を、同一群内の1アミノ酸に置き換えることを意味する。このような変更の一例として、バリンのメチオニンへの置換、およびその逆の置換がある。保存的置換の他の例は、下記表1を参照してよい。

【0056】

【表1】

表1：保存的アミノ酸置換。

脂肪族	非極性	GAP	ILV
	極性-非荷電	CSTM	NQ
	極性-荷電	DE	RK
芳香族			HFYW
その他			N

【0057】

このような多様体は、直接合成するか、または部位特異的変異誘発などの標準的な組換えDNA技術を使用して調製してよい。挿入が行われる箇所では、合成DNAは、挿入箇所をコードするほか、挿入部位の両側にくる天然配列に対応した、両端の5'および3'領域をコードする。かかる両端の5'および3'領域には、配列を適切な酵素（複数可）で切り取り、その切り取られた部分に合成DNAを結合できるよう、天然配列の制限部位に対応する好都合な制限部位が含有されることになる。その後、こうして結合されたDNAが発現し、コードしたタンパク質を作る。これらの方法は、当技術分野で公知の多数の標準的なDNA配列操作技術の実例にすぎず、他の公知技術を使用してもよい。HOXC12およびHOXD12に由来する請求の範囲のアミノ酸60個の配列または多様体また

はそれらの一部との少なくとも50%の配列同一性を保持する多様体は、その細胞透過性という特徴を維持し、かつ、ヒトの特徴を保持することにより、免疫原性となる可能性が低くなるであろうと考えられる。非人工的に存在するH O X配列または合成H O X配列が膜を移行する能力は、当技術分野で公知の日常的方法で試験してよい。配列番号1~19(表3)のアミノ酸をコードする任意のポリヌクレオチドまたは多様体またはその一部を本明細書の融合タンパク質または複合体で利用できる。

【0058】

第2の領域のペプチドまたはタンパク質：開示した、複合体または融合タンパク質の実施形態の第2の領域は、第1の領域と非人工的には会合していない任意のペプチドまたはタンパク質の配列を含んでよい。第1の領域をコードする遺伝子は、その他に第2の領域もコードするか、またはコードしなくてもよい。また、第2の領域も、第1の領域と同一種由来、非同種由来のいずれでもよい。ただし、第1および第2の領域は、非人工的な状況とは異なった態様で複合体または融合タンパク質の実施形態に現れることになる。

10

【0059】

融合タンパク質または複合体の実施形態の第2の領域は、融合タンパク質または複合体に含めた場合に標的上で生物学的に活性であるかぎり、任意の長さのペプチドまたはタンパク質であってよい。

【0060】

第2の領域の核酸：第2の領域は、治療的に活性な任意の核酸を含んでよい。ある実施形態では、核酸は、DNAまたはRNAであり得る。別の実施形態では、核酸はオリゴヌクレオチドまたはPNAである。

20

【0061】

ある実施形態では、第2の領域は、核酸塩基が標準アミノ酸を置換するPNAなどの任意のペプチド核酸を含んでよく、また、第2の領域は、遺伝子発現または他の生物学的プロセスに影響を与えるために、miRNAの拮抗または活性化を介して作用することを含め、治療的に活性であり得る。

【0062】

別の実施形態では、第2の領域は、PNAなどの任意のペプチド核酸を含んでよく、これにおいて、前記第2の領域は、遺伝子発現または他の生物学的プロセスに影響を与えるためにスプライシングまたは翻訳を活性化または抑制することによって、mRNAの拮抗または活性化を介して作用するなど治療的に活性であってよい。

30

【0063】

タンパク質／核酸複合体を含むある実施形態では、複合体は、細胞内にあるときにRISC複合体またはmiRNAに結合する第2の領域の一部として、核酸またはPNAをさらに含むことができる。例えば、miR132というmiRNAに結合すると、癌またはNF- κ Bが抑制され得る。このようなmiRNA分子への結合により安定な複合体が形成され得るが、これにおいて、未結合miRNAであれば通常は見られたであろう、遺伝子の発現に対するmiRNA分子の影響力を不能にすることができる。

【0064】

タンパク質／核酸複合体を含むいくつかの実施形態では、複合体は、細胞内にあるときにゲノムDNAに結合する第2の領域の一部として、核酸またはPNAをさらに含むことができる。例えば、転写因子結合部位でDNAに結合させると、転写因子の結合および／または活性を防いで、遺伝子の転写に影響を与え得る。

40

【0065】

タンパク質／核酸複合体を含むさらなる実施形態では、複合体は、細胞内にあるときにメッセンジャーRNAに結合する第2の領域の一部として、核酸、LNAまたはPNAをさらに含むことができる。例えば、DYRK1bメッセンジャーRNAに結合させると、DYRK1bの発現および／または翻訳を下方制御することができる。

【0066】

タンパク質／核酸複合体を含むさらなる実施形態では、複合体は、第2の領域の一部と

50

して、核酸（またはDNA）結合ドメインをさらに含むことができる。ある実施形態では、核酸結合ドメインを、特異的高親和性、およびタンパク質の構成要素と核酸またはRNAの構成要素との非共有結合的相互作用を仲介するために機能させてよい。

【0067】

核酸結合ドメインは、RNA結合領域またはDNA結合領域、例えば、転写因子、特に酵母またはヒト転写因子のDNA結合領域であってよい。例えば、GAL4誘導可能ドメインは、DNA配列CGGAGGACAGTCCCTCCG（配列番号82）に対するタンパク質の選択的結合を仲介する（Cavey et al J Mol Biol 209:423, 1989）。さらに、DNA結合領域はGAL4アミノ酸2～147個からなる。DNA結合領域は、第2のドメイン上で一本鎖DNAまたは二本鎖DNAに結合してよい。

10

【0068】

開示した、複合体または融合タンパク質の実施形態の他の用途として、抗菌性および抗ウイルス性処置の開発が含まれる。例えば、HOX遺伝子由来または他のヒトホメオドメイン由来の細胞透過性ペプチドを使用して、組換え抗体、非人工的に存在する自然免疫エフェクター分子またはDNA結合分子を感染細胞の細胞質内で輸送することができ、これにより、細菌、寄生虫の破壊、または細菌もしくはウイルスが複製する重要な段階の妨害を行う。

【0069】

好適なペプチドおよびタンパク質としては、治療および／または診断に応用されるものが含まれ、例えば、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、人工の免疫グロブリン様分子、一本鎖抗体、複合体、酵素、免疫共刺激分子、免疫調節分子、アンチセンスRNA、標的タンパク質のトランスドミナントネガティブ変異体、毒素、例えば、エンドトキシンA、コリシンA、d-エンドトキシン、ジフテリア毒素、桿菌アントロクス（anthrox）毒素、コレラ毒素、百日咳毒素、大腸菌の各種毒素、志賀毒素または志賀毒素様毒素、条件付き毒素などの毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質および成長因子、膜タンパク質、血管作動性タンパク質およびペプチド、抗ウイルスタンパク質およびリボザイム、並びに誘導体といった用途が含まれるが、これらに限定されない。このようなコード配列が含まれている場合、これらの配列は、典型的に、好適なプロモーターに機能的に連結されてよく、そのような好適なプロモーターは、リボザイム（複数可）の発現を駆動するプロモーター、または異なるプロモーター（単数または複数）であってよい。

20

30

【0070】

1以上の実施形態により、動物またはヒトの個体を遺伝子治療で治療するための医薬組成物を提供することができ、これにおいて、かかる組成物は、治療的有効量の複合体または融合タンパク質を含む。典型的には、個々の被検体に最も好適と考えられる実際の用量は医師により決定され、また、その個体ごとの年齢、体重および応答に応じて異なってくる。

【0071】

1以上の治療的分子、例えば、遺伝子またはタンパク質を送達する、融合タンパク質または複合体の実施形態を単独で、または他の治療もしくは治療成分と組み合わせて使用してよい。治療し得る疾患として、癌、神経疾患、遺伝性疾患、心疾患、脳卒中、関節炎、ウイルス性および細菌性感染症、並びに免疫系疾患が挙げられるが、これらに制限されない。好適な治療的遺伝子には、腫瘍抑制タンパク質、酵素、プロドラッグ活性化酵素、免疫調節分子、抗体、人工免疫グロブリン様分子、複合体、ホルモン、膜タンパク質、血管作動性タンパク質またはペプチド、サイトカイン、ケモカイン、抗ウイルスタンパク質、アンチセンスRNAおよびリボザイムをコードする遺伝子が含まれる。

40

【0072】

複合体は、サイトカインをコードする核酸またはサイトカインを1つまたは複数含んでもよい。好適なサイトカインおよび成長因子として、Apoe、Apo-SAA、BDNF、カルディオトロフィン-1、EGF、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン2が挙げられるが、これらに限定されない。Exodus-2、FGF酸性、FGF塩基性、

50

線維芽細胞増殖因子10 (Marshall 1998 Nature Biotechnology 16: 129)。FLT3リガンド (Kimuraら (1997)、フラクタルカイン (CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、インスリン、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72a. a.)、IL-8 (77a. a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、インヒビン α 、インヒビン β 、IP-10、ケラチノサイト成長因子2 (KGF-2)、KGFレプチン、LIF、リンホタクチン、ミューラ-管抑制物質、単球コロニー抑制因子、単球走化性タンパク質 (Marshall 1998 ibid)、M-CSF、MDC (67a. a.)、MDC (69a. a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP4、MDC (67a. a.)、MDC (69a. a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP4、骨髄前駆細胞阻害因子1 (MPIF-1)、NAP-2、ニューロツリン、神経成長因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、幹細胞因子 (SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、腫瘍壊死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNF-1、TPO、VEGF、GCP-2 GRO/IMGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、および1-309。相同であるサイトカインおよび成長因子は、好適な動物系におけるカーゴとして、研究用または獣医用途に使用することができる。

10

20

【0073】

開示した、融合タンパク質または複合体の実施形態は、当業者に公知のさらに好適なドメインを含んでよい。例えば、小胞体残留シグナルは、取り込まれた複合体またはタンパク質／核酸複合体の細胞内経路に影響を与えるよう機能する。好適な小胞体残留シグナルは、哺乳類の小胞体残留シグナルであってよい。

【0074】

また、核酸またはタンパク質の細胞小胞系からの流出を促進して、この経路による核酸輸送を増強するよう機能する、移行ドメインが存在してもよい。このドメインは、タンパク質／核酸が標的細胞に取り込まれた後にリソソームでの分解を受けづらくする、または受けないよう機能し得る。好適な移行ドメインは、毒素、特に、外毒素A、コリシンA、d-エンドトキシン、ジフテリア毒素、炭疽菌毒素、コレラ毒素、ペルッシス (Perussis) 毒素、大腸菌毒素の各種毒素、志賀毒素または志賀毒素様毒素のような細菌毒素から誘導可能である。

30

【0075】

第1の結合ドメインは、核以外に細胞部位も標的とするよう修飾してよい。

【0076】

さらに、または代替として、細胞表面構造を認識する標的細胞特異的結合ドメイン、例えば、標的細胞上の受容体タンパク質または表面抗原などを存在させてよい。

【0077】

本明細書の「複合体」または「複合体」という用語には、アミノ酸60個のヒトホメオドメイン配列または多様体またはその一部である第1の領域が、共有結合および非共有結合などのペプチド結合または別の結合を介して直接結合している、融合タンパク質などの構造部類が含まれる。複合体は、ホメオドメイン配列と、第1の領域に非人工的には会合していない、機能性または調節性のペプチドまたはタンパク質 (「カーゴ (積み荷)」ペプチド) である第2の領域とを結合するリンカー領域を含んでよい。当技術分野で公知の多種多様なリンカー (短い結合配列) の任意のリンカーを利用して複合体を形成してよいが、その際、リンカーの付加により複合体の機能が損なわれないことが条件となる。これにより、第2の領域は細胞膜または核膜を通して移行可能になる。例えば、当技術分野で公知の多種多様なリンカーについては、Chen et al. "Fusion protein linkers: property, design and functionality." Advanced Drug Delivery Reviews. <http://dx.doi.org>

40

50

g/10.1016/J.addr.2012.09.039を参照のこと。別の実施形態では、「融合タンパク質」という用語の使用により、複合体の形成に上記のようなリンカーを使用せず、ドメイン同士が完全にペプチド結合で連結されている場合に存在する、複合体の特定下位部類を意味する。

【0078】

第1の(HOXまたは他のヒトホメオドメイン)領域および第2の(カーゴ)領域を、切断可能なリンカー領域で連結してよく、このリンカー領域は、その付加により複合体の機能が損なわれない限り、リンカーの目的に好適な任意の領域であってよい。切断可能なリンカー領域は、プロテアーゼで切断可能なリンカーであるが、例えば、低分子で切断可能な他のリンカーを使用してよい。これらのリンカーには、臭化シアンで切断可能なMe t-X部位、ヒドロキシルアミンで切断可能なA s n-G l y、弱酸で切断可能なA s p-P r o、および特に、NBS-スカトールで切断可能なT r p-Xが含まれる。プロテアーゼによる切断部位は、より穏やかな切断条件を必要とし、例えば、第X a因子、トロンビンおよびコラゲナーゼに見られる。これらのいずれを使用してもよい。正確な配列は当該技術分野で利用可能であり、当業者は問題なく好適な切断部位を選択するであろう。一例として、第X a因子が標的とする、プロテアーゼによる切断領域はI E G R (配列番号83)である。エンテロキナーゼが標的とする、プロテアーゼによる切断領域はD D D K (配列番号84)である。トロンビンが標的とする、プロテアーゼによる切断領域はL V P R G (配列番号85)である。切断可能なリンカー領域は、細胞内プロテアーゼが標的とするリンカー領域であってよい。リンカーは、機能に必要というわけではないが、第1領域と第2の領域の間にリンカーを含めて、機能を損なうことなく第2の領域を標的に合わせて放出させる、またはリンカーの切断で第2の領域の生物学的活性を高めてよい。

【0079】

【表2】

表2-Chenら(2012年)の一部を修正した、当技術分野で公知でリンカー一覧の一部を示す。

(GGGS) _n 、ここで、n = 1、2、3、または4 (配列番号86)
(Gly) _n 、ここで、n = 6または8 (配列番号87)
(EAAAK) _n 、ここで、n = 1~3 (配列番号88)
A(EAAAK) ₄ LEA(EAAAK) ₄ A (配列番号89)
PAPAP (配列番号90)
AEAAAKEAAAKA (配列番号91)
(Ala-Pro) _n 、ここで、n = 10~34 aa (配列番号92)
VSQTSKLTR↓AETVFPDV (配列番号93)
PLG↓LWAC (配列番号94)
RVL↓AEA (配列番号95) ; EDVCC↓SMSY (配列番号96) ; GGIEGR↓GS (配列番号97)
TRHRQPR↓GWE (配列番号98) ; AGNRVRR↓SVG (配列番号99) ; RRRRRRR↓R↓R (配列番号100)
GFLG↓ (配列番号101)
A(EAAAK) ₄ LEA(EAAAK) ₄ A (配列番号89)
↓ = この位置で切断可能

【0080】

開示の実施形態により、具体的な治療処置用に同定済みの多数のペプチドのうち任意のものを細胞内および核内の作用部位へ効率的に移行させることを含む、高い治療的作用を得ることができ、これにおいて、(i) 標的組織はCNSであり、かつ、(ii) 標的組

織を問わず、かかる移行により、複合体の暴露および／もしくは有効性を減じる、または有害なもしくは望ましくない臨床的事象を発生させるような、望ましくない免疫応答を生じさせることがない。「第2の領域」の生物学的に活性なペプチドは、ヒトホメオドメイン配列または多様体またはその一部（「第1の領域」）に結合される前は、それらに非人工的には会合していない。

【0081】

さらに、さまざまな実施形態では、複合体または融合タンパク質は、やはりカーゴペプチドを含む第3の領域を含んでよい。図3aおよび3bは、アミノ酸60個のヒトホメオドメイン（「第1の領域」、ここでは短縮して表示）を含む別の実施形態、および、融合タンパク質または複合体に、それらが作用する細胞部位を標的にさせ得るさらなるカーゴタンパク質を示す。図3aにおいて、左にあるヒトHOXD12ホメオドメイン（1）は、そのC末端（4）で、関心対象である生物学的に活性なカーゴペプチド（「第2の領域」）（2）のN末端（5）に連結しており、一方、関心対象である第3のカーゴペプチド（「第3の領域」）（7）は、そのN末端（8）で「第2の領域」（2）のC末端（6）に連結している。この第3の領域は、融合タンパク質全体にペプチド結合を介して連結または融合した状態のままであるか、または、標的とした組織内の特定部位への取り込みもしくは結合終了後に除去するよう設計してよい。

10

【0082】

図3bは別の実施形態を示しており、右にあるヒトHOXD12ホメオドメイン（1）は、そのN末端（3）で第2の領域（2）のC末端（6）に連結しており、一方、第3の領域のカーゴペプチド（7）は、第2の領域（2）のN末端（5）で連結している。連結は、単純なペプチド結合（13）または当技術分野で公知のリンカー配列（12）、またはこれらの組み合わせであってよいが、その際、リンカー配列の付加により複合体の機能が損なわれないことが条件となる。第2のカーゴペプチド（「第3の領域」）（7）は、複合体または融合タンパク質に、それが作用する細胞部位を標的にさせ得る。実施例2を参照のこと。

20

【0083】

本明細書の複合体および融合タンパク質の実施形態は、文献に記載の任意の標準的分子生物学技術にしたがって作製してよい。例えば、Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. John Wiley & Sonsを参照のこと。使用できる精製方法などの製造方法は、米国特許第7,968,512号にも開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0084】

「発現ベクター（複数可）」または「プラスミド（複数可）」（本明細書では同じ意味で使用される）を使用して、異種DNAを宿主細胞に導入して発現または複製させるための複合体またはその構成要素を作製してよい。当業者が選択する適切なベクターは、その意図した用途、すなわち（DNA増幅またはDNA発現）、ベクターに挿入すべきDNAのサイズ、およびベクターによる形質転換の対象となる宿主細胞に応じて異なる。各ベクターは、その意図した用途に応じたさまざまな構成要素を含有し、これには、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終結配列およびシグナル配列、が1つまたは複数含まれる。

40

【0085】

核酸の供給源は、公表されている文献またはNCBIもしくはEMBLなどの組織から提供されているデータベースを参照して確認できる。目的配列の同定は、BLAST、BLAT、または他の相同性検索アルゴリズムを使用して達成できる。さらに、所望する第1または第2の領域をコードする核酸は、材料提供に積極的な学術的供給者または商用供給者から入手するか、または、配列データしか利用可能でない場合は適切な配列の合成もしくはクローニングにより得てよい。その場合は、一般に、対象遺伝子のクローニングに関する記載のある文献情報を参照して実施してよい。あるいは、利用可能な配列データが

50

限られている場合、または公知の核酸と相同であるかもしくは別に関連している核酸の発現が所望される場合、例示的な核酸を、当技術分野で公知の核酸配列にハイブリダイズさせるヌクレオチド配列として特徴づけることができる。

【0086】

「ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー」という語句は、高分子核酸のハイブリッドが安定でいられる条件をいう。このような条件は当業者に明らかである。また、当業者に理解されているとおり、ハイブリッドの安定性は、配列相同性が1%低下するごとに約1~1.5℃下がる、ハイブリッドの融解温度(T_m)に反映される。一般に、ハイブリッドの安定性とは、ナトリウム⁺の濃度と温度の関数である。ハイブリダイゼーション反応は、典型的には、高ストリンジェンシー条件下で実施され、その後、異なるストリンジェンシーで洗浄を行う。

10

【0087】

本明細書で使用する場合、「高ストリンジェンシー」という語句は、Na⁺を1M、65~68℃で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみがハイブリダイゼーションされるような条件をいう。高ストリンジェンシー条件は、例えば、6*SSC、5*デンハルト溶液、1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、0.1ピロリン酸ナトリウム⁺および非特異的競合因子としての0.1mg/ml変性サケ精子DNAを含有する水溶液中でハイブリダイゼーションすることにより得ることができる。ハイブリダイゼーション後に、高ストリンジェンシーでの洗浄を幾つかの工程に分けて行い、0.2~0.1*SSC、0.1%SDS中でハイブリダイゼーション温度にて最終洗浄（約30分）を行ってよい。

20

【0088】

「中等度のストリンジェンシー」という語句は、温度が約60~62℃である点を除いて、上記溶液中でのハイブリダイゼーションと同等の条件をいう。その場合、最終洗浄は、ハイブリダイゼーション温度にて1*SSC、0.1%SDS中で実施する。

【0089】

低ストリンジェンシーとは、上記溶液中で約50~52℃でのハイブリダイゼーションと同等の条件をいう。その場合、最終洗浄は、ハイブリダイゼーション温度にて2*SSC、0.1%SDS中で実施する。

【0090】

これらの条件は、さまざまな緩衝剤、例えば、ホルムアミド系緩衝剤、およびさまざまな温度を使用して適用および再現され得ることが理解される。デンハルト溶液およびSSCは、他の好適なハイブリダイゼーション緩衝剤同様、当業者には周知である（例えば、Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New YorkまたはAusubel, et al., eds. (1990) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと）。最適ハイブリダイゼーション条件は、プローブの長さおよびGC含量も関与しているため、経験的に決定されなければならない。

30

【0091】

ある実施形態では、複合体または融合タンパク質を、例えば、植物細胞（藻類を含む）内、大腸菌などの細菌内、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞もしくは酵母細胞などの真核細胞内で組換え合成を行うための核酸配列およびプロモーターを含む発現ベクターを使用することにより作製してよい。

40

【0092】

別の実施形態では、宿主細胞を発現ベクターで形質転換する。

【0093】

さらに別の実施形態では、核酸配列は、組換え技術により合成および製造を行うために、複合体または融合タンパク質をコードする。

【0094】

いくつかの実施形態では、複合体または融合タンパク質は非変性であり、これは、複合体または融合タンパク質が無傷細胞内のタンパク質に見られる3次元構造をとっている、

50

天然の状態で存在し得ることを意味する。

【0095】

「非変性」という用語は、特定の非変性化工程も示し得るが、必ずしも必要ではない。変性により、タンパク質分子の3次元形状が変わり、タンパク質分子のペプチド結合は破断されないが、ジスルフィド結合の破断、または、変性させる過程に、その3次元構造全体の変更も伴う場合はタンパク質の特定の群の化学的修飾が起こり得る。

【0096】

別の実施形態では、複合体または融合タンパク質を再生させる、すなわち、変性タンパク質を変性前の元のコンホメーションに戻す過程を行う。可逆的変性は、ペプチドの場合は一般にジスルフィド結合の還元剤および尿素によって、また、核酸の場合は熱および塩によって起こる。

【0097】

ある実施形態では、第1の領域は第2の領域のN末端にある。別の実施形態では、第1の領域は第2の領域のC末端にある。

【0098】

複合体および融合タンパク質の調製過程で、例えば、Zachariou, M. (2010) Affinity Chromatography: Methods and Protocols, 2nd Ed. Totowa, NJ:Humana Pressに記載のような開示の実施形態にしたがって、当技術分野で公知の精製方法を使用してよい。複合体または融合タンパク質は、細菌または真核細胞の溶解物から得ることができ、変性試薬、pHのわずかな変化、および浸透圧差が、ペプチドの移行特性に影響を与え得る。H O X由来のペプチドを含め、ヒトホメオドメインペプチドを得て精製するための条件を本明細書に開示する。

【0099】

H O Xペプチド-複合体が細胞表面の膜を通して移行する能力は、組換えタンパク質のコンホメーションに依存し得る。例えば、細菌細胞抽出物、または少量の界面活性剤（イオン性および非イオン性）もしくは変性剤（尿素またはグアニジニウム（guanidinium））に暴露された精製タンパク質を使用してポリペプチドを移行させると、移行が防げられるまたは抑制され得る。このコンホメーション依存的な特性は、H O Xペプチド-複合体または他のヒトホメオドメイン複合体を天然条件下で精製すると保存することができる。

【0100】

ある実施形態では、第1の領域（ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部）および第2の領域（生物学的に活性なペプチドまたはタンパク質）はいずれも、細菌溶解物から精製する。別の実施形態では、複合体または融合タンパク質は、植物細胞溶解物から精製する。さらに別の実施形態では、複合体または融合タンパク質は、真核細胞溶解物、培地または発酵ブロスから精製する。

【0101】

ある実施形態は、複合体または融合タンパク質の調製方法であり、

(a) 宿主細胞内の発現ベクターから前記複合体を発現させる条件下で宿主細胞を培養すること、および

(b) 前記複合体を回収することを含み、これにおいて、回収は、

(i) アミノ酸尾部または別の特異的リガンドを前記複合体に融合させ、ここで、尾部は、少なくとも1つの基質に結合することができるが別の基質には結合せず、また、前記複合体または融合タンパク質は、少なくとも1つの基質に尾部を介して結合させられ、かつ、前記宿主細胞の構成要素はこの基質に結合しない、および

(ii) 前記複合体および残りの宿主細胞構成要素を別の基質と接触させ、その別の基質に前記複合体は結合しないが残りの宿主細胞構成要素は結合するようにすることを含む、複合体または融合タンパク質の調製方法である。

【0102】

別の実施形態は、複合体または融合タンパク質の調製方法であり、

(i) プロモーターに機能的に連結され、融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベ

10

20

30

40

50

クターにより形質転換した宿主細胞を培養し、これにおいて、

(a) 第1の領域は、H O Xペプチドまたは他のヒトホメオドメインペプチドを含み、

(b) 前記第1の領域に非人工的には会合していない第2の領域は、前記宿主細胞内の発現ベクターから前記融合タンパク質を発現させる条件下で、ペプチドまたはタンパク質を含むこと、および

(i i) 前記融合タンパク質を回収し、かかる回収方法は、アミノ酸尾部または別のリガンドを前記複合体に融合させることを含み、ここで、尾部は、少なくとも1つの基質に結合することができるが別の基質には結合せず、また、前記複合体を少なくとも1つの基質に尾部を介して結合させ宿主細胞の構成要素がこの基質に結合しないようにすること、および、前記複合体を別の基質と接触させ、その別の基質に前記複合体は結合しないが残りの宿主細胞の構成要素は結合するようにすることを含む、複合体または融合タンパク質の調製方法である。

10

【0103】

アフィニティー精製過程に含まれる別の実施形態では、複合体または融合タンパク質に結合している尾部またはリガンドの使用が実施形態に含まれ、これにより、陽性および陰性いずれの精製工程も可能である。

【0104】

第1および第2の領域の結合配列すべてに、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端またはカルボキシ末端いずれにでも加えることができる。このような配列は、F L A Gタグ(D Y K D D D D K) (配列番号102)、m y cタグ(E Q K L I S E E D L) (配列番号103)、H i sタグ(H H H H H H (配列番号80)、H H H H H H G S (配列番号104)などで、後者はG Sリンカーを利用している。図4および5を参照のこと)、および他に当業者に公知の同様のタグを含んでよい。さらに、ビオチン受容タンパク質(G L N D I F E A Q K I E W H E) (配列番号105)などのリガンドを活性B i r Aタンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトホメオドメインペプチドの第1の領域のN末端にくるのではなく精製ドメインのN末端にくることになる。いずれのタグについても、当技術分野で公知のペプチドリinkerを使用し精製後に特異的プロテアーゼで除去してよい。

20

【0105】

ある実施形態では、アミノ酸尾部またはリガンドを複合体のC末端に融合させる。例えば、図4は、生物学的に活性であるカーゴペプチド(2)を含む実施形態を示しており、かかるペプチドは、そのC末端(6)でペプチド結合(13)または当技術分野で公知のリンカー配列(12)いずれかにより、ここでは短縮表示したヒトホメオドメインの「第1の領域」(1)のN末端(3)に連結している。H i sタグ(「尾部」)の付いたG Sリンカー(14)がカーゴペプチド(2)のC末端(6)に示されている。リンカーは、複合体の機能を損なわせないかぎり任意のリンカーを使用してよい。

30

【0106】

ある実施形態では、固定化基質はニッケルカラムもしくはコバルトカラム、アビジンカラム、またはアミノ酸尾部に対する親和性を有する抗体カラムである。別の実施形態では、複合体のアミノ酸尾部を、尾部と親和性のある少なくとも2つの固定化基質に連続的に接触させるが、その場合、ニッケルカラムもしくはコバルトカラムおよび／またはアビジンおよび／または抗体を任意の順序で使用してよい。

40

【0107】

別の実施形態では、複合体の精製方法は、アミノ酸尾部またはリガンドを、複合体または融合タンパク質に融合させることを含み、ここで、尾部は、少なくとも1つの基質に結合することができるが不純物は第2の基質にしか結合できず、また、かかる複合体を別の基質と接触させて、その別の基質に複合体は結合されないが残りの不純物は結合するようにすることを含む。

【0108】

50

別の実施形態によれば、アミノ酸60個のヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部を含む、複合体または融合タンパク質、および生物学的に活性であるペプチドまたはタンパク質を作製および精製するための方法は、複合体または融合タンパク質を発現ベクターから発現させるために宿主細胞を培養し、その後、当技術分野で公知のアフィニティ精製技術を使用して複合体または融合タンパク質を回収することを含む。

【0109】

第2の領域がDNA結合領域である場合は、核酸を用いて形成した複合体を混合することによって核酸を有する複合体を形成してよい。

【0110】

さらなる実施形態には、本明細書に開示した実施形態の複合体または融合タンパク質を含む医薬組成物、および複合体または融合タンパク質を疾患治療用薬物の調製に使用する方法が含まれる。

【0111】

ある実施形態では、複合体または融合タンパク質は、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部に連結している、機能酵素である生物学的に活性なペプチドまたはタンパク質を含む。

【0112】

他の実施形態は、同定されている状態または疾患を治療するためのあらゆる製剤を含む。

【0113】

配列番号21および配列番号22の上流の作製・標的タンパク質の発現を制御でき、TEVで切断可能なN末端のHisタグが付いた、ホメオボックス候補の2タンパク質PPL-002（配列番号21、表3）とPPL-003（配列番号22、表3）の細菌発現構成体を、T7ベクター系において作製した。T7発現系は、動物での効力試験のための材料作製に好適であるが、他の発現ベクター／発現系も企図され、分子生物学／生物工学技術分野の当業者には公知である。

【0114】

合成により作製し、コドンを最適化した遺伝子配列をベクターにクローニングし、カナマイシン選択法で選択したタンパク質の誘導発現を行った。ホメオボックスタンパク質PPL-002（例えば、プラスミドpJ411:129925）およびPPL-003（例えば、pJ411:129926）のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、それぞれ、図6および図7に示す。発現したタンパク質の各々は、SAAの転移配列の付いた6HISリーダー配列（配列番号80）、およびそれに続くTEV切断部位（ENLYFQS）（配列番号81）を含有し、適切なN末端を有するPPL-002またはPPL-003配列を与える。

【0115】

DH5αへの形質転換の際、各構成体につき6クローンを、挿入部の存在について制限酵素消化により試験した。合成したDNA配列の配列決定を確認のため行った。各タンパク質について発現が検証・確認された構成体を使用して、Invitrogenから市販されている菌株、大腸菌BL21(DE3)（www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/invitrogen）を形質転換し、発現が最良のクローンそれぞれについてPDグリセロール細胞ストックを調製した。

【0116】

発現最適化の予備試験をフラスコ振盪培養で実施した。小規模培養槽への移動時、細胞増殖のさらなる最適化を実施した。初期の酸素供給およびpH設定値約7.1が最適であった。導入温度を約18℃で最適化した。

【0117】

本明細書に開示する組成物の実施形態は、薬理的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含んでよい。「薬理的に許容される担体、希釈剤または賦形剤」という用語は、それ自体は治療剤ではないが、治療剤を被検体に送達するための担体またはビヒクルとし

10

20

30

40

50

て使用される物質、または、医薬組成物への添加によりその組成物の取扱いもしくは保管特性が改善されるかまたは組成物の単位用量の形成が可能もしくは容易になる物質であり、忍容できない毒性または組成物の他成分との相互作用を生じることのないあらゆる物質をいう。

【0118】

薬理学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤をどれにするかは、製剤および意図される投与経路、並びに標準的薬務に基づいて選択してよい。このような組成物は、体内コンパートメント、組織、細胞内もしくは核内の標的部位への侵入を助長、調節、放出または増強し得る任意の薬剤、例えば、結合剤（複数可）、滑沢剤（複数可）、懸濁剤（複数可）、コーティング剤（複数可）、溶解補助剤（複数可）などの薬剤を含んでよい。長時間暴露および作用させるために、タンパク質を持続的に放出させる注射可能なインプラントを使用してもよい。「持続的放出」という用語は、複合体が緩徐に放出され活性濃度での長期間暴露が可能な放出をする製剤をいう。

10

【0119】

本明細書に開示する複合体または融合タンパク質を1以上含む組成物は、治療すべき状態または他の考慮すべき事項に応じて、あらゆる方法、例えば、非限定的に、以下の1以上の任意の方法で投与することができる：（1）吸入；（2）坐剤またはペッサリーの形態；（3）外用のローション、溶液、クリーム、軟膏または撒布粉剤の形態；（4）皮膚パッチの使用；（5）デンプンまたはラクトースなどの賦形剤を含有する錠剤形態、または、カプセルもしくはオビュール（ovule）（賦形剤との混合剤または単剤）、または、矯味剤もしくは着色剤を含有するエリキシル剤、溶液もしくは懸濁液の形態での経口投与；（6）例えば、陰茎海綿体内、静脈内、筋肉内もしくは皮下への非経口注入；（7）眼疾患用に、点眼剤として、もしくは眼内注射用に製剤化し得る；（8）非経口投与用には、例えば、溶液を血液と等張にするために適切な塩もしくは単糖類成分を含む他の物質、または緩徐な放出を可能にする物質を含有し得る、滅菌水溶液または注射可能なインプラントの形態であってよい；（9）バツカルまたは舌下投与では、組成物は、一般的方法で製剤化できる錠剤または薬用ドロップの形態で投与し得る。

20

【0120】

ある実施形態では、複合体は、

（1）ヒトH O X遺伝子、または（2）配列番号1～19のいずれかに記載の配列を有する他のヒト遺伝子に由来する構造を含んでおり、これにおいて、1～20、1～15、または1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、および／または挿入されている第1の領域、および

30

第2の領域は、第1の領域に非人工的には会合していない、機能性または調節性のポリペプチドまたはタンパク質であること、を含む。さまざまな実施形態では、第2の領域は、NBDペプチド、PC1 CTT由来p200、PC1 CTT由来p21、グルコセレブロシダーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、イズロニデート（iduronidate）-2-スルファターゼ、網膜のグアニル酸シクラーゼ、ZF6xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体、ZF12xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体、およびZF18xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体からなる群から選択される。

40

【0121】

ある実施形態では、複合体は、

（1）ヒトH O X遺伝子、または（2）配列番号1～19のいずれかに記載の配列を有する他のヒト遺伝子に由来する構造を含んでおり、これにおいて、1～20、1～15、または1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、および／または挿入されており、また、前記アミノ酸は、（i）ヒトホメオドメイン活性を有するアミノ酸、（ii）ヒトH O X遺伝子または細胞透過化特性を備えるホメオドメインを含有する他のヒト遺伝子のヘリックス領域が持つ細胞透過化活性を維持するアミノ酸である、第1の領域、および第2の領域は、第1の領域に非人工的には会合していない、機能性または調節性のポリペ

50

プチドまたはタンパク質であることを含む。さまざまな実施形態では第2の領域は、NB Dペプチド、PC1 CTT由来p200、PC1 CTT由来p21、グルコセレブロシダーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、イズロニデート (iduronidate) -2-スルファターゼ、網膜グアニル酸シクラーゼ、ZF6xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体、ZF12xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体、およびZF18xHunt-Kox-1ジンクフィンガーペプチド構成体、からなる群から選択される。

【0122】

ある実施形態では、細胞培養における融合タンパク質または複合体の活性濃度は、約115 μ M未満、約100 μ M未満、約90 μ M未満、約80 μ M未満、約70 μ M未満、約65 μ M未満、約60 μ M未満、約55 μ M未満、約50 μ M未満、約45 μ M未満、約40 μ M未満、約35 μ M未満、約30 μ M未満、約25 μ M未満、約20 μ M未満、約15 μ M未満、約10 μ M未満、約5 μ M未満、または約1 μ M未満であり、例えば、約1 μ M未満～約3 μ M、約1 μ M未満～約6 μ M、約1 μ M未満～約8 μ M、約1 μ M未満～約15 μ M、約1 μ M未満～約25 μ M、約1 μ M未満～約50 μ M、約1 μ M未満～約70 μ M、約1 μ M未満～約85 μ M、約1 μ M未満～約110 μ M、約10 μ M未満～約110 μ M、約15 μ M未満～約70 μ M、約15 μ M未満～約60 μ M、約20 μ M未満～約55 μ M、または約25 μ M未満～約45 μ Mである。

【0123】

別の実施形態では、マウスモデルにおいて（マウス20gあたり）（1）静脈内（i.v.）または腹腔内（i.p.）注射、（2）局所製剤、または（3）吸入製剤により送達される用量（連日または必要に応じ）は、少なくとも500 μ g、少なくとも450 μ g、少なくとも400 μ g、少なくとも350 μ g、少なくとも300 μ g、少なくとも250 μ g、少なくとも200 μ g、少なくとも150 μ g、少なくとも100 μ g、少なくとも80 μ g、少なくとも70 μ g、少なくとも60 μ g、少なくとも50 μ g、少なくとも40 μ g、少なくとも30 μ g、少なくとも20 μ g、少なくとも10 μ g、または、少なくとも1 μ gであり、例えば、約1 μ g～約500 μ g、約10 μ g～約450 μ g、約20 μ g～約400 μ g、約30 μ g～約350 μ g、約30 μ g～約200 μ g、約30 μ g～約100 μ g、約40 μ g～約300 μ g、約40 μ g～約200 μ g、約50 μ g～約100 μ g、約50 μ g～約90 μ g、約55 μ g～約85 μ g、約60 μ g～約80 μ g、約60 μ g～約100 μ g；約1 μ g～約200 μ g；約1 μ g～約100 μ g、約1 μ g～約90 μ g、約1 μ g～約80 μ g、約1 μ g～約70 μ g、約1～約60 μ g、約1～約50 μ g、約1～約40 μ g、約1～約30 μ g、約1～約20 μ g、約1～約15 μ g、約1～約12 μ g、約1～約10 μ g、約1～約8 μ g、約1～約6 μ g、約1～約4 μ g、または約1～約3 μ gである。

【0124】

別の実施形態では、マウスモデルにおいて静脈内（i.v.）または腹腔内（i.p.）注射により送達される用量（連日または必要に応じ）は、少なくとも100mg/kg、約80mg/kg未満、約45mg/kg未満、約40mg/kg未満、約30mg/kg未満、約25mg/kg未満、約20mg/kg未満、約15mg/kg未満、約12mg/kg未満、約10mg/kg未満、約8mg/kg未満、約4mg/kg未満、約2mg/kg未満、または約1mg/kg未満であり、例えば、約1mg/kg未満～約50mg/kg、約5mg/kg～約40mg/kg、約8mg/kg～約30mg/kg、約10mg/kg～約20mg/kg、または約12mg/kg～約15mg/kg、約8mg/kg～約12mg/kg、約5mg/kg～約9mg/kg、約3mg/kg～約6mg/kg、約2mg/kg～約5mg/kg、約2mg/kg～約4mg/kg、約1mg/kg～約3mg/kg、約1mg/kg～約2.0mg/kgである。

【0125】

別の実施形態では、ヒトにおいて（体重70kg）吸入製剤により送達される用量（連日または必要に応じ）は、少なくとも約600mg、少なくとも約500mg、少なくと

10

20

30

40

50

も約450mg、少なくとも約400mg、少なくとも約350mg、少なくとも約300mg、少なくとも約250mg、少なくとも約200mg、少なくとも約150mg、少なくとも約125mg、少なくとも約100mg、少なくとも約75mg、少なくとも約50mg、少なくとも約25mg、少なくとも約20mg、少なくとも約15mg、少なくとも約10mg、少なくとも約5mg、少なくとも約1mg、少なくとも約500μg、少なくとも約450μg、少なくとも約400μg、少なくとも約350μg、少なくとも約300μg、少なくとも約250μg、少なくとも約200μg、少なくとも約150μg、少なくとも約100μg、少なくとも約80μg、少なくとも約70μg、少なくとも約60μg、少なくとも約50μg、少なくとも約40μg、少なくとも約30μg、少なくとも約20μg、少なくとも約10μg、または、少なくとも約1μgであり、例えば、約1μg～約750μg；約1μg～約500μg、約10μg～約450μg、約20μg～約400μg、約30μg～約350μg、約30μg～約200μg、約30μg～約100μg、約40μg～約300μg、約40μg～約200μg、約50μg～約100μg、約50μg～約90μg、約55μg～約85μg、約60μg～約80μg、約60μg～約100μg；約1μg～約200μg；約1μg～約100μg、約1μg～約90μg、約1μg～約80μg、約1μg～約70μg、約1～約60μg、約1～約50μg、約1～約40μg、約1～約30μg、約1～約20μg、約1～約15μg、約1～約12μg、約1～約10μg、約1～約8μg、約1～約6μg、約1～約4μg、約1μg～約3μg、約1μg～約1mg、約1μg～約2mg、約1μg～約5mg；約1μg～約10mg；約1mg～約10mg、約1mg～約15mg；約2mg～約20mg、約3mg～約30mg、約4mg～約40mg、約5mg～約50mg、約5mg～約80mg、約5mg～約110mg、約10mg～約150mg、約10mg～約80mg、約20mg～約70mg、約20mg～約60mg、約30mg～約60mg、約120mg～約190mg、約130mg～約180mg、約130mg～約200mg、約140mg～約250mg、約180mg～約300mg、約190mg～約350mg、約220mg～約400mg、約250mg～約425mg、約280mg～約460mg、約300mg～約480mg、約350mg～約490mg、約380mg～約550mg、約400mg～約580mg、約480mg～約590mg、または約520mg～約600mgである。

【0126】

別の実施形態では、マウスモデルおよびヒトにおいて局所製剤により送達される用量（連日または必要に応じ）は、約5wt/vol未満%、約4.5wt/vol%未満、約3.5wt/vol%未満、約2.5wt/vol%未満、約1.5wt/vol%未満、約0.5wt/vol%未満、約0.4wt/vol%未満、約0.3wt/vol%未満、約0.2%未満、約0.1wt/vol%未満、約0.09wt/vol%未満、約0.08wt/vol%未満、約0.07wt/vol%未満、約0.06wt/vol%未満、約0.05wt/vol%未満、約0.04wt/vol%未満、約0.03wt/vol%未満、約0.02wt/vol%未満、約0.01wt/vol%未満、約0.008wt/vol%未満、約0.006wt/vol%未満、約0.004wt/vol%未満、または約0.002wt/vol%未満であり、例えば、範囲は約0.002wt/vol%～約5wt/vol%、約0.01wt/vol%～約4wt/vol%、約0.05wt/vol%～約3wt/vol%、約0.02wt/vol%～約2.5wt/vol%、約0.03wt/vol%～約2wt/vol%、約0.05wt/vol%～約1wt/vol%、約0.06wt/vol%～約0.9wt/vol%、約0.07wt/vol%～約0.6wt/vol%、約0.08wt/vol%～約0.4wt/vol%、約0.09wt/vol%～約0.2wt/vol%、または約0.09wt/vol%～約0.1wt/vol%である。

【0127】

別の実施形態では、ヒトにおいて（体重70kg）局所製剤により送達される用量（連日または必要に応じ）は、約70μg未満、約50μg未満、約45μg未満、約40μ

10

20

30

40

50

g 未満、約 30 μ g 未満、約 25 μ g 未満、約 20 μ g 未満、約 15 μ g 未満、約 12 μ g 未満、約 10 μ g 未満、約 8 μ g 未満、約 4 μ g 未満、約 2 μ g 未満、または、約 1 μ g 未満であり、例えば、約 1 μ g ～約 50 μ g、約 5 μ g ～約 40 μ g、約 8 μ g ～約 30 μ g、約 10 μ g ～約 20 μ g、または約 12 μ g ～約 15 μ g、約 8 μ g ～約 12 μ g、約 5 μ g ～約 9、約 3 μ g ～約 6 μ g、約 2 μ g ～約 5 μ g、または約 1 μ g 未満～約 3 μ g である。

【0128】

別の実施形態では、ヒトにおいて、静脈内、皮下もしくは筋肉内への注射または徐放性製剤用の注射可能なインプラントにより送達される全身用量（連日または必要に応じ）は、約 100 mg/kg 未満、約 80 mg/kg 未満、約 45 mg/kg 未満、約 40 mg/kg 未満、約 30 mg/kg 未満、約 25 mg/kg 未満、約 20 mg/kg 未満、約 15 mg/kg 未満、約 12 mg/kg 未満、約 10 mg/kg 未満、約 8 mg/kg 未満、約 4 mg/kg 未満、約 2 mg/kg 未満、約 1 mg/kg 未満、約 0.1 mg/kg 未満、または約 0.01 mg/kg 未満であり、例えば、約 0.01 mg/kg 未満～約 50 mg/kg、約 5 mg/kg 未満～約 40 mg/kg、約 8 mg/kg 未満～約 30 mg/kg、約 10 mg/kg 未満～約 20 mg/kg、または約 12 mg/kg 未満～約 15 mg/kg、約 8 mg/kg 未満～約 12 mg/kg、約 5 mg/kg 未満～約 9 mg/kg、約 3 mg/kg 未満～約 6 mg/kg、約 2 mg/kg 未満～約 5 mg/kg、約 2 mg/kg 未満～約 4 mg/kg、約 1 mg/kg 未満～約 3 mg/kg、約 0.2 mg/kg 未満～約 2.0 mg/kg、約 0.1 mg/kg 未満～約 1.5 mg/kg、または約 0.01 mg/kg 未満～約 2.00 mg/kg である。

【0129】

別の実施形態では、静脈内、皮下、もしくは筋肉内注射または持続的放出用注射可能なインプラント、吸入もしくは局所製剤以外の任意の製剤によりヒト（体重 70 kg を基準）に送達される用量（連日または必要に応じ）は、少なくとも約 600 mg、少なくとも約 500 mg、少なくとも約 450 mg、少なくとも約 400 mg、少なくとも約 350 mg、少なくとも約 300 mg、少なくとも約 250 mg、少なくとも約 200 mg、少なくとも約 150 mg、少なくとも約 125 mg、少なくとも約 100 mg、少なくとも約 75 mg、少なくとも約 50 mg、少なくとも約 25 mg、少なくとも約 20 mg、少なくとも約 15 mg、少なくとも約 10 mg、少なくとも約 5 mg、少なくとも約 1 mg、少なくとも約 500 μ g、少なくとも約 450 μ g、少なくとも約 400 μ g、少なくとも約 350 μ g、少なくとも約 300 μ g、少なくとも約 250 μ g、少なくとも約 200 μ g、少なくとも約 150 μ g、少なくとも約 100 μ g、少なくとも約 80 μ g、少なくとも約 70 μ g、少なくとも約 60 μ g、少なくとも約 50 μ g、少なくとも約 40 μ g、少なくとも約 30 μ g、少なくとも約 20 μ g、少なくとも約 10 μ g、または、少なくとも約 1 μ g であり、例えば、範囲は約 1 μ g ～約 750 μ g；約 1 μ g ～約 500 μ g、約 10 μ g ～約 450 μ g、約 20 μ g ～約 400 μ g、約 30 μ g ～約 350 μ g、約 30 μ g ～約 200 μ g、約 30 μ g ～約 100 μ g、約 40 μ g ～約 300 μ g、約 40 μ g ～約 200 μ g、約 50 μ g ～約 100 μ g、約 50 μ g ～約 90 μ g、約 55 μ g ～約 85 μ g、約 60 μ g ～約 80 μ g、約 60 μ g ～約 100 μ g；約 1 μ g ～約 200 μ g；約 1 μ g ～約 100 μ g、約 1 μ g ～約 90 μ g、約 1 μ g ～約 80 μ g、約 1 μ g ～約 70 μ g、約 1 ～約 60 μ g、約 1 ～約 50 μ g、約 1 ～約 40 μ g、約 1 ～約 30 μ g、約 1 ～約 20 μ g、約 1 ～約 15 μ g、約 1 ～約 12 μ g、約 1 ～約 10 μ g、約 1 ～約 8 μ g、約 1 ～約 6 μ g、約 1 ～約 4 μ g、約 1 μ g ～約 3 μ g、約 1 μ g ～約 1 mg、約 1 μ g ～約 2 mg、約 1 μ g ～約 5 mg；約 1 μ g ～約 10 mg；約 1 mg ～約 10 mg、約 1 mg ～約 15 mg；約 2 mg ～約 20 mg、約 3 mg ～約 30 mg、約 4 mg ～約 40 mg、約 5 mg ～約 50 mg、約 5 mg ～約 80 mg、約 5 mg ～約 110 mg、約 10 mg ～約 150 mg、約 10 mg ～約 80 mg、約 20 mg ～約 70 mg、約 20 mg ～約 60 mg、約 30 mg ～約 60 mg、約 120 mg ～約 190 mg、約 130 mg ～約 180 mg、約 130 mg ～約 200 mg、約 140 mg ～約 2

50mg、約180mg～約300mg、約190mg～約350mg、約220mg～約400mg、約250mg～約425mg、約280mg～約460mg、約300mg～約480mg、約350mg～約490mg、約380mg～約550mg、約400mg～約580mg、約480mg～約590mg、または約520mg～約600mgである。

【0130】

ある実施形態では、製剤を、所望の利益を誘導するか、そうではなくても治療的效果を提供するために、全身または局所的に（例えば、眼内注射、浣腸製剤、吸入）6時間、12時間、連日または隔日または1週間もしくは1か月に1回の間隔で投与する。別の実施形態では、製剤を、所望の利益を誘導するか、そうではなくても治療的效果を提供するために、必要に応じて投与する。

10

【0131】

別の実施形態では、心筋梗塞後（MI）心拍出量の改善は、超音波で評価される。別の実施形態では、脳卒中後の神経学的機能の改善は、発症後1か月のNIHSSスコアが17未満の患者の割合を測定することにより評価される。別の実施形態では、ヒトホメオドメインもしくは多様体もしくはその一部の複合体または融合タンパク質の免疫原性は、リンパ球による3H-チミジンの取り込みを測定することにより評価される。別の実施形態では、ヒトホメオドメインもしくは多様体もしくはその一部の複合体または融合タンパク質の免疫原性は、レシピエントの動物またはヒトで産生された特異抗体濃度の測定により評価される。別の実施形態では、虚血再灌流傷害度は、脳卒中モデルにおける壊死組織領域を調べるための公知の組織病理学的技術を使用して評価される。さらに別の実施形態では、GAG蓄積は、公知の組織病理学的技術を使用して評価される。別の実施形態では、ハンチントン舞蹈病のマウスモデルにおける行動および運動障害は、公開されている、ビームテスト用ロータロッド上で協調性を評価する方法および前足握力を評価する方法を使用して評価される。別の実施形態では各転帰は、公知の方法で評価される。

20

【0132】

ある実施形態では、ヒトまたは動物の被検体1個体以上を、融合タンパク質または複合体の任意の開示実施形態で治療の際、被検体（複数可）1以上の以下の転帰を示すと考えられる：

- (a) 息切れまたは呼吸困難の減少；
- (b) サイトカイン産生の低下；
- (c) TNF- α の血中濃度の低下；
- (d) IL-1の血中濃度の低下；
- (e) IL-6の血中濃度の低下；
- (f) 気管支肺泡洗浄液（BALF）の炎症細胞数の減少；
- (g) BALFサイトカインレベル（例えば、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8）の低下；
- (h) 肺機能（例えば、FEV1）の改善；
- (i) 機能的（運動を含む）能力の改善；
- (j) 救急の治療または入院を要するCOPD増悪の低下；
- (k) 涙液分泌の正常値への回復；
- (l) 脱毛の減少；
- (m) 毛髪の成長促進；
- (n) MRIにおける脳組織の壊死領域の縮小；
- (o) C反応性タンパク質（CRP）の減少；
- (p) 急性の死亡率（すなわち、発症後1か月）の低下；
- (q) 超音波測定による心筋梗塞後（MI）心拍出量の改善；
- (r) 発症後1か月のNIHSSスコアが17未満である患者の割合を測定して求めた、脳卒中後の神経学的機能の改善；
- (s) 腎肥大の抑制；

30

40

50

(t) カーゴである第2の領域のみを使用した先の治療に比較して、アミノ酸60個のヒトホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質に対するアレルギー反応および輸注反応の軽減；

(u) 抗カーゴペプチド特異性抗体レベルの低下；

(v) G C a s e 基質のグリコシルセラミド (glycosylceramide) の蓄積の減少；

(w) デルマトン硫酸の尿中排泄の減少；

(x) ヘパラン硫酸の尿中排泄の減少；

(y) 網膜電図 (E R G) に見る機能の回復；

(z) 標準的臨床方法で測定した視力の回復；

(a a) ハンチントン病統一評価尺度 (U H D R S) の合計運動スコア、および／または臨床的に検証済みの他のスコアリング方法を使用して評価した場合の正常化または運動障害の改善；

(b b) 成長および発育を評価する標準的な小児科技術により評価した際の骨格発達の正常化；

(c c) 標準的な小児科技術により評価した際の脳の発達の正常化；

(d d) M R I で評価した腎嚢胞の肥大化および数の増加の遅延；

(e e) 血液中の抗炎症性インターロイキン10 (I L - 10) レベルの上昇；

(f f) B A L F 中の抗炎症性インターロイキン10 (I L - 10) レベルの上昇；

(g g) 血液中の I P - 10 レベルの低下；

(h h) B A L F 中の I P - 10 レベルの低下；および／または

(i i) 血液中のアミロイドAタンパク質 (S A A) の低下；

(j j) 血中または B A L F 中のマウス K c またはヒト I L - 8 の低下；

(k k) 血中または B A L F 中の G M - C S F の低下；

(l l) 硝子体混濁の段階および／または前房内細胞の段階の進行予防；

(m m) 視力の悪化予防；

(n n) 腫瘍細胞の増殖抑制および／または腫瘍の増殖抑制；

(o o) D Y R K 1 b の発現抑制；および／または

(p p) N F - κ B の調節を受けた遺伝子の活性化抑制。

【0133】

別の実施形態では、患者は、例えば、約1日から生涯の期間、約1日～約200週間、約1日～約100週間、約1日～約80週間、約1日～約50週間、約1日～約40週間、約1日～約20週間、約1日～約15週間、約1日～約12週間、約1日～約10週間、約1日～約5週間、約1週間～約4週間、約2週間～約3週間、約1日～約2週間、約1週間、約1～5日、約1～3日、または約1～2日の期間にわたり、治療を受けることになる。

【0134】

提供した実施例における計画されている任意の研究、ヒトおよび動物に応用するための動物調査研究など他の調査研究および治療、並びに獣医学的治療において使用する融合タンパク質製剤または複合体製剤を含む別の実施形態では、治療群を構成する対象者、または治療群（複数可）は、特に明記しない限り、それぞれベースラインまたは対照と比較して、1以上の以下の転帰を示すと考えられる：

(a) N F - κ B の転写活性の阻害；

(b) サイトカイン産生の低下；

(c) T N F - α の血中濃度の抑制；

(d) I L - 1 の血中濃度の抑制；

(e) I L - 6 の血中濃度の抑制；

(f) 気管支肺胞洗浄液 (B A L F) の炎症細胞数の減少；

(g) 気管支肺胞洗浄液 (B A L F) のサイトカインレベル（例えば、T N F - α 、I L - 1、I L - 6、I L - 8）の減少；

(h) 角膜上皮の杯細胞浸潤の低下；

- (i) 結膜杯細胞の消失の減弱；
- (j) リンパ管新生の低下；
- (k) 涙液分泌の正常値への回復；
- (l) 脱毛の減少または毛髪成長促進；
- (m) MRIにより評価した脳組織の壊死領域の減少；
- (n) C反応性タンパク質（CRP）の減少；
- (o) 急性の死亡率（すなわち、1か月）の低下；
- (p) 超音波測定による心筋梗塞後（MI）心拍出量の改善；
- (q) 脳卒中発症後1か月のNIHSSスコアが17未満である患者の割合により測定した脳卒中後の神経学的機能の改善； 10
- (r) 腎肥大の抑制；
- (s) ヒトホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体、例えば、HOXC12-p200またはHOXD12-p200を用いた治療で誘導された変化と比較した場合の、オステオカルシン血中濃度の弱い変化；
- (t) リンパ球による3H-チミジンの取り込みから評価した、アミノ酸60個のヒトホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質に対するアレルギー反応および輸注反応の軽減；
- (u) 抗カーゴペプチド特異性抗体レベルの減少；
- (v) GCASE基質のグリコシルセラミド（glycosylceramide）の蓄積の減少；
- (w) 脳におけるα-シヌクレイン／ユビキチン凝集体の蓄積の減少； 20
- (x) デルマタン硫酸の尿中排泄の減少；
- (y) ヘパラン硫酸の尿中排泄の減少；
- (z) 組織病理学により測定したデルマタン硫酸の低下；
- (aa) 組織病理学により測定したヘパラン硫酸の低下；
- (bb) 網膜電図（ERG）に見る機能の回復；
- (cc) 標準的臨床方法で測定した視力の回復；
- (dd) HDマウスモデルにおける変異型ハンチンチン遺伝子の発現の低下または抑制；
- (ee) ハンチントン病統一評価尺度（UHDRS）の合計運動スコアを使用して評価した、患者の運動障害の正常化または改善；
- (ff) 公開されている、ビームテスト用ロータロッド上で協調性を評価する方法および前足握力を評価する方法を使用して評価した、マウスの運動障害の正常化または改善； 30
- (gg) HDマウスモデルにおいて分子的手法および組織学的解析により評価した、神経細胞の消失および／または線条体細胞の容積縮小の減少；
- (hh) 血液中の抗炎症性インターロイキン10（IL-10）レベルの上昇；
- (ii) BALF中の抗炎症性インターロイキン10（IL-10）レベルの上昇；
- (jj) 血液中のIP-10レベルの低下；
- (kk) BALF中のIP-10レベルの低下；
- (ll) 血液中の血清アミロイドAタンパク質（SAA）の低下；
- (mm) 血中またはBALF中のヒトIL-8の減少；
- (nn) 血中またはBALF中のGM-CSFの低下； 40
- (oo) 硝子体混濁の段階および／または前房内細胞の段階の進行予防；
- (pp) 視力の悪化予防；
- (qq) 腫瘍細胞の増殖抑制および／または腫瘍の増殖抑制；
- (rr) DYRK1bの発現抑制；および／または
- (ss) NF-κBの調節を受けた遺伝子の活性化抑制。

【0135】

別の実施形態では、臨床試験において融合タンパク質および／または複合体の開示実施形態を含む製剤を用いた治療は、例えば、約1日～約52週間、約1日～約26週間、約1日～約16週間、約1日～約12週間、約1日～約10週間、約1日～約5週間、約1週間～約4週間、約2週間～約3週間、約1日～約2週間、約1週間、約1～6日、約1 50

～4日、または約1～2日の期間にわたり延長されることが考えられる。

【0136】

別の実施形態では、融合タンパク質および／または複合体の開示実施形態を含む製剤を用いた治療に際し、動物モデルにおけるマウスなどの実験動物を含む、実施例の試験に開示の(1)患者(複数可)または(2)治療群(複数可)は、対照と比較して以下の転帰を1以上示す：

(a) NF- κ Bの転写活性が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%))抑制される；

(b) 血中および／またはBALF中のサイトカイン産生および／または濃度が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%))低下する；

(c) TNF- α 血中濃度および／またはBALF中濃度が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%))低下する；

(d) IL-1血中濃度および／またはBALF中濃度が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%))低下する；

(e) IL-6血中濃度および／またはBALF中濃度が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%))低下する；

10

20

30

40

50

(f) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の炎症細胞数が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 % (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) 減少する；

(g) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) のサイトカイン (例えば、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8) が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 % (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) 低下する；

(h) 角膜上皮の杯細胞浸潤が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 % (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) 減少する；

(i) 結膜杯細胞の消失が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 % (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) 減弱する；

(j) リンパ管新生が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 % (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) 低下する；

(k) シルマー試験により測定した、シルマー試験紙の濡れる長さが、20 mm 以上、15 mm 以上、10 mm 以上、5 mm 以上、例えば、5 mm～20 mm、10 mm～20 mm、5 mm～15 mm、5 mm～10 mm または 15 mm～20 mm (ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化 (%) または変化の中央値 (%)) の範囲で長くなり、涙液分泌が正常値へ向け回復する；

(l) 脱毛の減少または毛髪成長促進が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少

10

20

30

40

50

なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）である；

(m) 脳組織の壊死領域が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）減少する；

(n) 血清C反応性タンパク質(CRP)が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）低下する；

(o) 急性の死亡率（すなわち、1か月）が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）低下する；

(p) 超音波で測定した場合の心筋梗塞後(MI)心拍出量が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）改善する；

(q) 発症後1か月のNIHSSスコアが17未満である患者の割合により測定した、脳卒中後の神経学的機能が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）改善する；

(r) 腎肥大が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少な

10

20

30

40

50

くとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））抑制される；

（s）HOX C12-p21、HOX D12-p21、または p21 を含有する他の融合タンパク質もしくは複合体を使用し、細胞膜透過化特性が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（例えば、HOX C12-p200 の融合タンパク質もしくは複合体、または細胞膜透過化特性を有するヒトホメオドメインを含む、他の p200 含有融合タンパク質もしくは複合体を用いた治療により誘導された変化と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））であるヒトホメオドメインを含む血液中のオステオカルシン濃度の変化が弱い；

（t）アミノ酸 60 個のヒトホメオドメイン（または多様体またはその一部）複合体または融合タンパク質に対するアレルギー反応および輸注反応の低下を、これらのカーゴタンパク質のみ輸注した場合と比較し、リンパ球による 3H-チミジンの取り込み評価が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（実際の変化（%）または変化の中央値（%）ベースラインまたは対照を基準）である；

（u）アミノ酸 60 個のヒトホメオドメイン（または多様体またはその一部）複合体または融合タンパク質を用いた治療後の抗カーゴペプチド特異性抗体レベルを、これらのカーゴタンパク質のみを用いた治療と比較した場合、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（実際の変化（%）または変化の中央値（%）ベースラインまたは対照を基準）低下する；

（v）GC a s e 基質のグリコシルセラミド (glycosylceramide) の蓄積が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）ま

10

20

30

40

50

(w) α-シヌクレイン／ユビキチン凝集体の脳内蓄積が、少なくとも約 99 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 10 %、または、少なくとも約 5 %、例えば、約 30 %～約 99 %、約 80 %～約 90 %、約 70 %～約 90 %、約 60 %～約 90 %、約 50 %～約 90 %、約 40 %～約 90 %、約 35 %～約 90 %、約 30 %～約 90 %、約 25 %～約 90 %、約 5 %～約 85 %、または約 10 %～約 80 %（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））低下する；

10

20

30

40

50

%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））が回復する；

（c c）標準的臨床方法で測定した視力が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））が回復する；

10

（d d）HDマウスモデルにおける変異型ハンチンチン遺伝子の発現が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））低下するまたは抑制される；

20

（e e）患者の運動障害をハンチントン病統一評価尺度（UHDRS）の合計運動スコアを使用して評価した場合に、絶対量で、少なくとも約4ポイント、少なくとも約3ポイント、少なくとも約2ポイント、少なくとも約1.5ポイント、少なくとも約1ポイント、少なくとも約0.5ポイント、少なくとも約0.4ポイント、少なくとも約0.3ポイント、または、少なくとも約0.2ポイント、例えば、約0.5～約2ポイント、約1～約2ポイント、または約1.5～約2.5ポイントの正常化もしくは改善があり、さらに／または合計運動スコアが、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、約10%～約80%、約10%～約30%、約10%～約20%、約20%～約40%、約30%～約50%（ベースラインおよび未治療対照群と比較）改善する；

30

（f f）マウスにおける運動障害を、公開されている、ビームテスト用ロータロッド上で協調性を評価する方法および前足握力を評価する方法を使用して評価した場合に、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、約10%～約80%、約10%～約30%、約10%～約20%、約20%～約40%、約30%～約50%（ベースラインおよび未治療対照群と比較）正常化または改善する；

40

（g g）HDマウスモデルにおいて分子的手法および組織学的解析により評価した場合に、神経細胞消失の減少および／または線条体細胞の容積縮小が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少

50

なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））である；

（h h）血漿中（血中）および／またはBALF中のIL-10が、少なくとも約3,000%、少なくとも約2,000%、少なくとも約1,000%、少なくとも約500%、少なくとも約380%、少なくとも約360%、少なくとも約340%、少なくとも約320%、少なくとも約300%、少なくとも約280%、少なくとも約260%、少なくとも約240%、少なくとも約220%、少なくとも約200%、少なくとも約180%、少なくとも約160%、少なくとも約140%、少なくとも約120%、少なくとも約110%、少なくとも約100%、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約400%～約500%、約450%～約500%、約420%～約480%、約300%～約450%、約350%～約430%、約320%～約380%、約200%～約350%、約250%～約330%、約220%～約280%、約100%～約250%、約150%～約230%、約120%～約180%、約50%～約150%、約60%～約130%、約80%～約110%、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））増加する；

（i i）血中またはBALF中のIL-10が、最少約300 pg/mLまで、少なくとも約400 pg/mLまで、最少約500 pg/mLまで、最少約600 pg/mLまで、最少約800 pg/mLまで、最少約1000 pg/mLまで、最少約1200 pg/mLまで、最少約1400 pg/mLまで、最少約1600 pg/mLまで、最少約1800 pg/mLまで、最少約2000 pg/mLまで、最少約2200 pg/mLまで、最少約2400 pg/mLまで、最少約2600 pg/mLまで、最少約2800 pg/mLまで、最少約3000 pg/mLまで、少なくとも約4000 pg/mLまで、例えば、約300 mg/mL～約3900 pg/mL、約380 pg/mL～約2900 pg/mL、約400 pg/mL～約2800 pg/mL、約450 pg/mL～約2500 pg/mL、約500 pg/mL～約2400 pg/mL、約800 pg/mL～約3000 pg/mL、約900 pg/mL～約2900 pg/mL、約1200 pg/mL～約2900 pg/mL、約1400 pg/mL～約2900 pg/mL、約1800 pg/mL～約2900 pg/mL、約2000 pg/mL～約2900 pg/mL、約2200 pg/mL～約2900 pg/mL、約2500 pg/mL～約3000 pg/mL、または約2500 pg/mL～約3000 pg/mL増加する。

（j j）血中およびBALF中のIP-10レベルが、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化（%）または変化の中央値（%））増加する。

10

20

30

40

50

)) 減少する、

(kk) 血液(血漿)中の血清アミロイドAタンパク質(SAA)が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%~約99%、約80%~約90%、約70%~約90%、約60%~約90%、約50%~約90%、約40%~約90%、約35%~約90%、約30%~約90%、約25%~約90%、約5%~約85%、または約10%~約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%))または変化の中央値(%))低下する；

10

(ll) 血中および/またはBALF中のマウスKcまたはヒトIL-8が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%~約99%、約80%~約90%、約70%~約90%、約60%~約90%、約50%~約90%、約40%~約90%、約35%~約90%、約30%~約90%、約25%~約90%、約5%~約85%、または約10%~約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%))または変化の中央値(%))低下する；

(mm)；血中またはBALF中のGM-CSFが、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%~約99%、約80%~約90%、約70%~約90%、約60%~約90%、約50%~約90%、約40%~約90%、約35%~約90%、約30%~約90%、約25%~約90%、約5%~約85%、または約10%~約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%))または変化の中央値(%))低下する；

20

(nn) 当該分野の専門家に公知の一般的に認められている臨床基準に基づいた、硝子体混濁の段階および/または前房内細胞の段階の臨床上有意味な進行を予防する。

30

(oo) 当該分野の専門家に公知の一般的に使用され認められている基準に基づいた、臨床上有意味な視力変化の悪化を予防する；

(pp) 腫瘍細胞の増殖抑制および/または腫瘍の増殖抑制が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%~約99%、約80%~約90%、約70%~約90%、約60%~約90%、約50%~約90%、約40%~約90%、約35%~約90%、約30%~約90%、約25%~約90%、約5%~約85%、または約10%~約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%))または変化の中央値(%))である；および/または

40

(rr) DYRK1bの発現抑制が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%~約99%、約80%~約90%、約70%~約90%、約60%~約90%、約50%~約90%、約40%~約90%、約35%~約90%、約30%~約90%、約25%~約90%、約5%~約85%、または約10%~約80%(ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%))または変化の中央値(%))である；および/または

50

(ss) NF- κ Bの調節を受けた遺伝子の活性化が、少なくとも約99%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約80%、少なくとも約70%、少なくとも約60%、少なくとも約50%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または、少なくとも約5%、例えば、約30%～約99%、約80%～約90%、約70%～約90%、約60%～約90%、約50%～約90%、約40%～約90%、約35%～約90%、約30%～約90%、約25%～約90%、約5%～約85%、または約10%～約80%（ベースラインまたは対照と比較した、実際の変化(%)または変化の中央値(%)）抑制される。

【0137】

開示実施形態およびそれらの修正形態によれば、複合体または融合タンパク質を単独で、または他の治療の別の治療剤もしくは成分と組み合わせて使用してよい。治療され得る疾患および障害または状態としては、癌、炎症または炎症性疾患、皮膚障害、発熱、心血管系作用、出血、凝固および急性期応答、悪液質、拒食症、急性感染症、HIV感染症、ショック状態、移植片対宿主反応、自己免疫疾患、再灌流傷害、髄膜炎、片頭痛およびアスピリン依存的抗血栓状態；腫瘍の増殖、浸潤および進展、血管新生、転移、悪性、腹水および悪性胸水；脳虚血、虚血性心疾患、変形性関節症、関節リウマチ、骨粗鬆症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化、脳卒中、血管炎、クローン病および潰瘍性大腸炎；歯周炎、歯肉炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水疱症；角膜潰瘍、網膜症および手術創治癒；鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー；再狭窄、うっ血性心不全、子宮内膜症、アテローム性動脈硬化またはエンドサイエローシス(endoscierosis)、サイトカインおよび細胞増殖活性／細胞分化活性；免疫抑制活性または免疫賦活薬活性（例えば、ヒト免疫不全ウイルス感染症などの免疫不全治療のため；リンパ球増殖調節のため；癌および多くの自己免疫疾患の治療のため、および移植拒絶の予防または腫瘍免疫の誘発のため）；造血調節、例えば、骨髄系またはリンパ系の疾患の治療；骨、軟骨、腱、靱帯および神経の組織の成長促進、例えば、創傷の治癒、熱傷、潰瘍および歯周病の治療、および神経変性；卵巣刺激ホルモンの阻害または活性化（妊孕性の調節）；走化性／化学走性活性（例えば、特定の細胞種を傷害部位または感染部位に動員するため）；止血活性および血栓溶解活性（例えば、血友病および脳卒中の治療のため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショックまたはクローン病の治療のため）；抗菌剤として；例えば、代謝または挙動の調節因子；鎮痛薬として；特定の欠乏障害の治療；ヒトの、例えば、乾癬治療、または獣医療；マクロファージ抑制活性および／またはT細胞抑制活性による抗炎症作用；抗免疫活性、すなわち無関係の応答を含む、細胞性および／または液性の免疫応答に対する抑制作用；マクロファージおよびT細胞の細胞外マトリックス構成要素およびフィブロネクチンへの結合能の抑制、ならびに上方制御を受けたfas受容体のT細胞での発現抑制；望ましくない免疫反応および炎症の抑制、例えば、関節リウマチなどの関節炎、過敏性に関連する炎症、アレルギー反応、喘息、全身性エリテマトーデス、膠原病および他の自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化、動脈硬化、アテローム動脈硬化性心疾患、再灌流傷害、心停止、心筋梗塞、血管の炎症性障害、呼吸窮迫症候群または他の心肺疾患に関連する炎症、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎および他の消化管疾患に関連する炎症、肝線維症、肝硬変または他の肝疾患、甲状腺炎または他の腺性疾患、糸球体腎炎または他の腎疾患および泌尿器疾患、耳炎または他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎または他の皮膚疾患、歯周病または他の歯科疾患、精巣炎またはエピディディモ(epididimo)-精巣炎、不妊症、orchid al 外傷または他の免疫関連精巣疾患、胎盤機能障害、胎盤機能不全、習慣流産、子癇、子癇前症および他の免疫疾患および／または炎症関連婦人科領域疾患、後部ぶどう膜炎、中間部ぶどう膜炎、前部ぶどう膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、網膜ぶどう膜炎、視神経炎、眼内炎症、例えば、網膜炎または囊胞様黄斑浮腫、交感性眼炎、サイエリティス(scieritis)、網膜色素変性、変性フォンデュス(fondus)疾患の免疫性および炎症性構成要素、眼外傷の炎症性構成要素、感染による眼の炎症、増殖性硝子体網膜症、急性虚血性視神経症、例えば、緑内障手術後の

10

20

30

40

50

過渡の癍痕化、眼内インプラントに対する免疫性および／または炎症性反応および他の免疫関連および炎症関連眼疾患、中枢神経系（CNS）でも他の任意の器官でも免疫および／または炎症の抑制による利益が考えられる自己免疫性の疾患または状態または障害に関連する炎症、パーキンソン病、パーキンソン病の治療による合併症および／または副作用、AIDS関連認知症複合HIV関連脳症、デビック病、シデナム舞踏病、アルツハイマー病および他のCNS変性の疾患、状態または障害、脳卒中の炎症性構成要素、ポリオ後症候群、精神障害の免疫構成要素および炎症構成要素、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性全脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギレム（Guillain）-バレー症候群、シデナム・コラ（chora）、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、CNSの圧迫またはCNSの外傷またはCNSの感染の、炎症性構成要素、筋萎縮症および筋ジストロフィの炎症性構成要素、および免疫関連および炎症関連の中枢神経系および末梢神経系の疾患、状態または障害、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染症、外科手術に伴う炎症性の合併症または副作用、骨髄移植または他の移植に伴う合併症および／または副作用、例えば、ウイルス性キャリア感染、またはAIDS関連性炎症による、遺伝子治療に伴う炎症性および／または免疫性の合併症および副作用、液性および／または細胞性免疫応答を抑制または阻害すること、角膜、骨髄、臓器、レンズ、ペースメーカー、非人工または人工の皮膚組織のような非人工または人工の細胞、組織および臓器を移植した場合の移植片拒絶の予防および／または治療のために単球または白血球の増殖性疾患、例えば、白血病を、単球またはリンパ球の量を減少させることによって治療または改善すること、が挙げられるが、これらに制限されない。

【0138】

10

20

【表 3】
表 3：ペプチド配列同一性.

配列 番号	識別子、または配列 が由来する遺伝子	配列
1	HOX C12	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWFQ NRRMKKKRLL
2	HOX D12	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNSDQQVKIWFQ NRRMKKKRVV
3	OTP	QKRHRTRFPAQLNELERSFAKTHYPDIFMREELALRIGLTESRVQVWFQ NRRAKWKKRK
4	TLX1	KKKPRTSFTRLQICELEKRFHRQKYLASAERAALAKALKMTDAQVKTWFQ NRRTKWRRQT
5	TLX3	RKKPRTSFSRVQICELEKRFHRQKYLASAERAALAKSLKMTDAQVKTWFQ NRRTKWRRQT
6	TLX2	RKKPRTSFSRSQVLELERRFLRQKYLASAERAALAKALRMTDAQVKTWFQ NRRTKWRRQT
7	NKX6-1	RKHTRPTFSGQQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAYSLGMTESQVKVWFQ NRRTKWKKKH
8	NKX6-2	KKHSRPTFSGQQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAYSLGMTESQVKVWFQ NRRTKWKKRH
9	NKX6-3	KKHTRPTFTGHQIFALEKTFEQTKYLAGPERARLAYSLGMTESQVKVWFQ NRRTKWKKKS
10	NKX3-2	KKRSRAAFSHAQVFELERRFNHQRYSGLPERADLAASLKLTTQVKIWFQ NRRYKTKRRQ
11	BARHL1	PRKARTAFTHQLAQLERSFERQKYL SVQDRMELAA SLNLTD TQVKTWYQ NRRTKWKRQT
12	BARHL2	PRKARTAFSDHQLNQLERSFERQKYL SVQDRMDLAA SLNLTD TQVKTWYQ NRRTKWKRQT
13	BARX1	GRRSRTVFTELQLMGLEKRFQKYLSTPDRIDLAE SLGLS QLQVKTWYQ NRRMKWKKIV
14	BARX2	PRRSRTIFTELQLMGLEKKFQKYLSTPDRDLAQSLGLTQLQVKTWYQ NRRMKWKKMV
15	BSX	RRKARTVFSDSQLSGLEKRFQKYLSTPERVELATASLSETQVKTWFQ NRRMKHKKQL

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
16	DLX2	VRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQ NRRSKFKKMW
17	DLX3	VRKPRTIYSSYQLAALQRRFQKAQYLALPERAELAAQLGLTQTQVKIWFQ NRRSKFKKLY
18	DBX1	GMLRRAVFSVDVQRKALEKMFQKQKYISKPD RKKLA AKLGLKDSQVKIWFQ NRRMKWRNSK
19	DBX2	GILRRAVFSEDQRKALEKMFQKQKYISKTD RKKLAINLGLKESQVKIWFQ NRRMKWRNSK
20	NEMO 結合ドメイン (「NBD」) (第2の領域のペプチドのみ)	TALDWSWLQTE
21	HOX C12-NBD (全体配列：配列番号1と20の組み合わせ)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLSDQQVKIWFQ NRRMKKKRLLTALDWSWLQTE
22	HOX D12-NBD (全体配列：配列番号2と20の組み合わせ)	ARKKKRPYTKQQAELNEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQ NRRMKKKRVVTALDWSWLQTE
23	PC1 CTT 由来の p200 ペプチド (第2の領域のペプチドのみ)	VILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGLSKVKEFRHKV RFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSSQLDGLSVSLGR LGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQHLSQLGRRSSR APAGSSRGPSGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPLRAKNKVHPSST
24	HOX C12-p200 (全体配列：配列番号1と23の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLSDQQVKIWF QNRRMKKKRLLVILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMG LSKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSS QLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQ LHSQLGRRSSRAPAGSSRGPSGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPL RAKNKVHPSST
25	HOX D12-p200 (全体配列：配列番号2と23の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKKRPYTKQQAELNEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWF QNRRMKKKRVVILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMG LSKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSS QLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQ LHSQLGRRSSRAPAGSSRGPSGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPL RAKNKVHPSST
26	p21 ペプチド (PKD 構造用の別の第2の領域ペプチド)	IRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
27	HOX C12-p21 (全体配列：配列番号 1 と 26 の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWF QNRMMKKKRLLIRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR
28	HOX D12-p21 (全体配列：配列番号 2 と 26 の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQAELNEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWF QNRMMKKKRVRIRRIRLWMGLSKVKEFRHKVR
29	VRQ397- (非競合的 V2 受容体 拮抗因子。p21 および p200 を含有する HOX またはヒトホメオドメイン融合ペプチドを標的に向かわせるためにタンパク質構造に結合可能)	CRAVKY
30	グルコセレブロシダーゼアミノ酸配列 (「GCCase」) (第 2 の領域のペプチドのみ)	ARPCIPKSFSGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFAEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ
31	HOX C12-GCCase (全体配列：配列番号 1 と 30 の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWF QNRMMKKKRLLARPCIPKSFSGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFAEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
32	HOX D12-GCase (全体配列：配列番号2と30の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWF QNRMRMKKRVARPCIPKSFSGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVGFGGAMTDAA ALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTP DDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNG AVNGKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAG LLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHNVRLMLDDQRLLLP HWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFNTMLFAS EACVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVAS QKNDLDAVALMHPDGSVVVVLNRSSKDVLTIKDPAVGFLETISPYSI HTYLWRRQ
33	RetGC-1 (第2の領域のペプチドのみ)	AVFTVGVLPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRPGLAGGPRFEVALL PEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAEEAGIALVPWG CPWTQAE GTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSL STALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPVRTAVIMVHVSLL GGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTHYALSPGPEALAAANSSQL RRAHDAVLTLTRHCPSGSLDSLRRARERELPSDLNLQVSPFLGTIY DAVFLARGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGLGGDEEPP FVLDDTAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGDPSCWF DPNNICGGGLEPGLVFLGFLVVGMLAGAFLAHYVRHRLHMQMVSGPN KIILTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHLDSPN IGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFLA RGAECPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLLQDLAQREIKLDWMFKSSLLDLI KGI RYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLLAQKVLPEPP RAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFLAIIIMQEVVCRSAPYAMLEL TPEEVVQVRSPPLCRPLVSMQAPVEICILLMKQCWAEQPELRPSMDHT FDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDR LLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEV VDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIAN MSLDILSAVGTFMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGD TVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGKAE DTFWLVGRRGFNKP IPKPPDLQPGSSNHGISLQEIPPERRRKLEKARPGQ FS

10

20

30

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
34	HOX C12-RetGC-1 (全体配列：配列番号 1 と 33 の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWF QNRMMKKRLLAVFTVGVLPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRPGL AGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLA EEAGIALVPWGCPWTQAEGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAP QDLWVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPVRT AVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHIALSPGPE ALAALANSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRRAQERRELPDDLNL QQVSPLFGTIYDAVFLARGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGF CGDLGGDEEPPFVLLDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFSLAGTRMHFPRGG SAPGPDPCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGLAFLAHYVRHR LLHMQMVSGPNKIILTVDITFLPHGGTSRKVAQGSRSSLGARMSDIR SGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHE NVALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSQDLLAQREIKLDW MFKSSLLLDLIKIRYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRL LEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIIMQEVV CRSAPYAMLELTPEEVVQVRSPPLCRPLVSMDQAPVEICILLMKQCWAE QPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTE ELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFT TISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQR NGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFMRHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVVG LTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELR GRTELKGKGAEDTFWLVGRRGFNKP IPKPPDLQPGSSNHGISLQEIPPER RRKLEKARPGQFS

10

20

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
35	HOX D12-RetGC-1 (全体配列：配列番号2と33の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVQKIWF QNRMRMKKRVRVAVFTVGLGPWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRDPGL AGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLA EEAGIALVPWGCPWTQAEGTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAP QDLWVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPVRT AVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHIALSPGPE ALAALANSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRRAQERRELPDNLN QQVSPLFGTIYDAVFLARGVAEAAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGF CGDLGGDEEPPFVLLDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFSLAGTRMHFPRGG SAPGDPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGLAFLAHYVRHR LLHMQMVSGPNKIILTVDITFLPHGGTSRKVAQGSRSSLGARMSMDIR SGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHE NVALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSQDLLEAQRKIDW MFKSSLLDLIKGIRYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRL LEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIIMQEVV CRSAPYAMLELTPEEVQVRVSRPPPLCRPLVSMDQAPVEICILMKQCWAE QPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTE ELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFT TISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYKVETIGDAYMVASGLPQR NGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFMRHMPEVPVIRIRGLHSGPCVAGVVG LTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELR GRTELKKGGAEDTFWLVGRRGFNKP IPKPPDLQPGSSNHGISLQEIPPER RRKLEKARPGQFS
36	ZF6xHunt-Kox-1 (第2の領域のペプチドのみ) 6 ジンクフィンガーの繰り返しを示す	TGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATL QRHTKIHTGSRPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQRATLQRHTKIHTGSRPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGGSSQLVSSLSPQ HSAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQ IVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPD SETAFEIKSSV
37	HOX C12-ZF6xHunt-Kox-1 (全体配列：配列番号1と36の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVQKIWF QNRMRMKKRRLTGAERPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSRPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSRPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGG GSQLVSSLSPQHSAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTRE EWWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWL VEREIHQETHPDSETAFEIKSSV

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
38	HOX D12-ZF6xHunt-Kox-1 (全体配列：配列番号2と36の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVQKIWF QNRMRMKKKRVVTGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGG GSQLVSSLSPQHSVATQGGIIKNKEGMDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTRE EEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVE REIHQETHPDSETAFEIKSSV
39	ZF12xHunt-Kox-1 (第2の領域のペプチドのみ) 12 ジンクフィンガーの繰り返しを示す	TGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATL QRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGGSGQLVGTAERP FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKI HTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRAT LQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR KFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGGSGQLVSSLSPQHSVATQ GGIIKNKEGMDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREWKLLDTAQQIVYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFE IKSSV
40	HOX C12-ZF12xHunt-Kox-1 (全体配列、配列番号1と39の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLSDQQVQKIWF QNRMRMKKKRLLTGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGG GSQLVGTAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKDGGGGSGGGSGGGSGQLVS SLSPQHSVATQGGIIKNKEGMDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREWKLL DTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQ ETHPDSETAFEIKSSV

10

20

30

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
41	HOX D12-ZF12xHunt-Kox-1 (全体配列、配列番号2と39の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDDQVQKIWF QNRMRMKKKRVVTGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGG GSQLVGTAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVS SLSPQHSVAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLL DTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQ ETHPDSETAFEIKSSV
42	ZF18xHunt-Kox-1 (第2の領域のペプチドのみ) 18 ジンクフィンガーの繰り返しを示す	TGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATL QRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVGTAERP FQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKI HTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRAT LQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR KFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVGTAERPFFQCRIC MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSE PPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTK IHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRA TLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVSSLPQHSVAVTQGI IKNK EGMDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYK NLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV
43	HOX C12-ZF18xHunt-Kox-1 (全体配列、配列番号1と42の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYTKQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRLNLSDDQVQKIWF QNRMRMKKKRLTGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGG GSQLVGTAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVG TAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ RHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSEPPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVSSLPQH SAVTQGI IKNKEGMDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQI VYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDS ETAFAEIKSSV

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
44	HOX D12-Zf12xHunt-Kox-1 (全体配列、配列番号2と42の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWF QNRMRMKKKRVVTGAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGG GSQLVGTAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA QRATLQRHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQRATLQRHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTG EKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVG TAERPFFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQ RHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQRATLQRHTKIHTGSEPFQCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQRATLQRHTKIHLRQKGGGGSGGGSGGGSGQLVSSLSPQH SAVTQGIKKNKEGMDAKSLTAWRTLVTFKDVFVDFTREEWKLDDTAQQI VYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIHQETHPDS ETAFEIKSSV
45	アルファ- α -イズロニダーゼ (第2の領域の653アミノ酸、第2の領域の27アミノ酸シグナル配列を含むペプチド)	MRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARALWPLRRFWRST GFCPPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTT GSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSAAGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHDFDNVSMQGFNLN YYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTG EAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEA DPLVGWSLPQPWRADVYAAMVVKVIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDN AFLSYHPHPFAQRTLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVLTAMGLLALLDEEQ LWAEVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHP NRSVAVTLRLRGVPPGGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRGRPVFPTAEQ FRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLHVHVCARPEKPPGQ VTRLRALPLTQQLVLVWSDEHVGSKCLWYEQFSQDGKAYTPVSRKPS TFNLFVFSPTDGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDVPVPLEVPVPRGPPSP GNP

10

20

30

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
46	HOX C12-アルファ-1-イズロニダーゼ (全体配列、配列番号1と45の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWF QNRMMKKKRLMRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHDAARA LWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVR THWLLELVTTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGH FTDFEDKQQVFWEKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFD NVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLR HCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPK FADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQHQNLLANTTS AFPYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTA RFQVNNTRPPHVQLLRKPVLT MGLLALLDEEQLWAEVSAQAGTVLDSNHTVGLASAHRPQGPADAWRAAVL IYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRR LGRP VFPTAEQFRMRRAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLVH VCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDHEVGSKCLWTYEIQFSQDG KAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVLY EVPVPRGPPSPGNP
47	HOX D12-アルファ-1-イズロニダーゼ (全体配列、配列番号2と45の組み合わせ、開始因子メチオニン残基も示されている)	MARKKKRPYTKQQAELNEFLVNEFINRQKRKELSNRLNSDQQVKIWF QNRMMKKKRVVMRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHDAARA LWPLRRFWRSTGFCPLPHSQADQYVLSWDQQLNLAYVGAVPHRGIKQVR THWLLELVTTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSASGH FTDFEDKQQVFWEKDLVSSLARRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFD NVSMTMQGFLNYYDACSEGLRAASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLR HCHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPK FADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADVTYAAMVVKVIAQHQNLLANTTS AFPYALLSNDNAFLSYHPHPFAQRTLTA RFQVNNTRPPHVQLLRKPVLT MGLLALLDEEQLWAEVSAQAGTVLDSNHTVGLASAHRPQGPADAWRAAVL IYASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRR LGRP VFPTAEQFRMRRAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPALRLPSLLLVH VCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDHEVGSKCLWTYEIQFSQDG KAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPVLY EVPVPRGPPSPGNP
48	イズロン酸-2-スルファターゼ (25 アミノ酸 シグナル配列を含む、第2の領域の550 アミノ酸配列)	MPPPRTGRLWLGLVLSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDL RPS LGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRPD TT RLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSP YSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRPGDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQ STEQAIQLEKMKTSASPFLLAVGYHKPHIPFRYPKEFKLYPLENITLA PDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQRKIRQSY FASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSN FDVATHVPLIFYVPGR TASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DL VELVSLFPTLAGLAGLVPPRCVPVSFHVLCREGKNLLKHFRFRDLEED PYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMGYSIRTIDYRYT VWVGFPNDEF LANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
49	HOX C12-イズロン酸-2-スルファターゼ (全体配列、配列番号1と48の組み合わせ、開始因子メチオニンもも示されている)	MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWF QNRMRMKKKRLMPPPRTRGRLLWLGLVSSVCVALGSETQANSTTDALNV LLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRV SFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGIVTMSVGKVFHP GISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRPGDGELHANLLCPVDVL DVPEGTLPDKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQ KLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPI VDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAL GEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQ LMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVSFHVLCREGKNLL KHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMG YSIRTIDYRYTVVWGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDS QGGDLFQLLMP
50	HOX D12-イズロン酸-2-スルファターゼ (全体配列、配列番号2と48の組み合わせ、開始因子メチオニンもも示されている)	MARKKRKPYTKQQAIELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNSDQQVKIWF QNRMRMKKKRVVMPPPRTRGRLLWLGLVSSVCVALGSETQANSTTDALNV LLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRV SFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGIVTMSVGKVFHP GISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRPGDGELHANLLCPVDVL DVPEGTLPDKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPPFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQ KLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPI VDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAL GEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQ LMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVSFHVLCREGKNLL KHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIIKIMG YSIRTIDYRYTVVWGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDS QGGDLFQLLMP
51	Ag85A99-118 エピトープに広がる4ペプチドのペプチド1つ (第2の領域の15アミノ酸配列、TB ワクチン)	ETFLTSELPGWLQAN
52	HOX C12-Ag85A99-118 エピトープの4ペプチドのペプチド1 (全体配列、配列番号1と51の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWFQ NRRMKKKRLLETFLTSELPGWLQAN

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
53	HOX D12-Ag85A99-118 エピトープの4ペプチドのペプチド1 (全体配列、配列番号2と51の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKRKPYTKQQLAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVQKIWFQ NRRMKKKRVVETFLTSELPGWLQAN
54	Ag85A99-118 エピトープに広がる4ペプチドのペプチド2 (第2の領域の15アミノ酸配列、TB ワクチン)	SELPQWLQANRHVKP
55	HOX C12-Ag85A99-118 エピトープ、4ペプチドのペプチド2 (全体配列、配列番号1と54の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVQKIWFQ NRRMKKKRLLSELPGWLQANRHVKP
56	HOX D12-Ag85A99-118 エピトープ、4ペプチドのペプチド2 (全体配列、配列番号2と54の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKRKPYTKQQLAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVQKIWFQ NRRMKKKRVVSELPGWLQANRHVKP
57	Ag85A99-118 エピトープに広がる4ペプチドのペプチド3 (第2の領域の15アミノ酸配列、TB ワクチン)	WLQANRHVKPTGSAV
58	HOX C12-Ag85A99-118 エピトープ、4ペプチドのペプチド3 (全体配列、配列番号1と57の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVQKIWFQ NRRMKKKRLLWLQANRHVKPTGSAV

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
59	HOX D12-Ag85A99-118 エピトープ、4 ペプチドのペプチド3 (全体配列、配列番号2 と 57 の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRVVWLQANRHVKPTGSAV
60	Ag85A99-118 エピトープに広がる 4 ペプチドのペプチド4 (第2の領域の15 アミノ酸配列、TB ワクチン)	RHVKPTGSAVVGLSM
61	HOX C12-Ag85A99-118 エピトープ、4 ペプチドのペプチド4 (全体配列、配列番号1 と 60 の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRLLRHVKPTGSAVVGLSM
62	HOX D12-Ag85A99-118 エピトープ、4 ペプチドのペプチド4 (全体配列、配列番号2 と 60 の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRVVRHVKPTGSAVVGLSM
63	Ag85A70-78 エピトープに広がる 3 ペプチドのペプチド1 (第2の領域の15 アミノ酸配列、TB ワクチン)	QSGLSVVMPVGGQSS
64	HOX C12-Ag85A70-78 エピトープ、3 ペプチドのペプチド1 (全体配列、配列番号1 と 63 の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRLLQSGLSVVMPVGGQSS

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
65	HOX D12-Ag85A70-78 エピトープ、3ペプチドのペプチド1 (全体配列、配列番号2と63の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRVRVQSGLSVMPVGGQSS
66	Ag85A70-78 エピトープに広がる3ペプチドのペプチド2 (第2の領域の15アミノ酸配列、TB ワクチン)	VMPVGGQSSFYSW
67	HOX C12-Ag85A70-78 エピトープ、3ペプチドのペプチド2 (全体配列、配列番号1と66の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRLLVMPVGGQSSFYSW
68	HOX D12-Ag85A70-78 エピトープ、3ペプチドのペプチド2 (全体配列、配列番号2と66の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRVRVVMPVGGQSSFYSW
69	Ag85A70-78 エピトープに広がる3ペプチドのペプチド3 (第2の領域の15アミノ酸配列、TB ワクチン)	GGQSSFYSWYQAC
70	HOX C12-Ag85A70-78 エピトープ、3ペプチドのペプチド3 (全体配列、配列番号1と69の組み合わせ、TB ワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRLLGGQSSFYSWYQAC
71	HOX D12-Ag85A70-78 エピトープ、3ペプチドのペプチド3 (全体配列、配列番号2と69の組み合わせ、TB ワクチン)	ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSQQVKIWFQ NRRMKKKRVRVGGQSSFYSWYQAC

10

20

30

40

配列番号	識別子、または配列が由来する遺伝子	配列
72	Ag85A エピトープ (第2の領域のカーゴ)	AFSRPGLP VEYLQVSPSPsmgRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLAmgDAGGYKAS DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WYICGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVDFDP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
73	HOX C12-Ag85A (全体配列、配列番号1と72の組み合わせ、TBワクチン)	SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWFQ NRRMKKKRLL AFSRPGLP VEYLQVSPSPsmgRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLAmgDAGGYKAS DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WYICGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVDFDP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
74	HOX D12-Ag85A (全体配列、配列番号2と72の組み合わせ、TBワクチン)	ARKKKRPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQ NRRMKKKRVV AFSRPGLP VEYLQVSPSPsmgRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLAmgDAGGYKAS DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WYICGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVDFDP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA

10

20

【0139】

以下に、さまざまな特徴および実施形態および選択修正について、非限定的な実施例として記載する。組換え合成ができるように完全配列に開始因子メチオニンを含んでいるすべての実施例では、開始因子メチオニンは、指定したヒトホメオドメイン配列を有する活性生成物を誘導するために精製中に除去してよい。完全な複合体の使用について記載した段落内の参照配列番号は、開始因子メチオニンを除去した後の複合体を指している。

30

【実施例】

【0140】

実施例1

アミノ酸60個のヒトホメオドメインおよびNF- κ B転写因子生成を抑制するカーゴNBDペプチドで構成される複合体または融合ペプチドまたはタンパク質は、タンパク質-タンパク質相互作用に干渉することにより遺伝子発現を調節する実施形態例である。

40

【0141】

ある実施形態では、HOXC12アミノ酸配列の第1の領域は配列番号1：
SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLNSDQQVKIWFQNRRMKKKRLL
である。

別の実施形態では、HOXD12アミノ酸配列の第1の領域は配列番号2：
ARKKKRPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRRMKKKRVV
である。

これらの2つの実施形態では、この第1の領域は、NF- κ B必須修飾因子(NEMO)

50

結合領域、略してNBD (NEMO binding domain) という、「カーゴ (積み荷)」ペプチドに、単純なペプチド結合または、代替としては、当技術分野で公知のリンカー (表2を参照のこと) を介して連結している。リンカーは、その付加により複合体の機能が損なわれない限り、任意のリンカーを使用してよい。NBDアミノ酸配列は、配列番号20の第2の領域であり：

TALDWSWLQTE

HOXC12の第1の領域 (配列番号1) を組み込んだ、2領域の連結にペプチド結合のみを含有する、融合タンパク質全体の配列の実施形態は：

配列番号21

SRKKRKPYSKLQLAELEGELVNEFITRQRRRELSDRNLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLTALDWSWLQTE

10

である。HOXD12の第1の領域 (配列番号2) を組み込んだ、2領域の連結にペプチド結合のみを含有する、融合タンパク質全体の配列の実施形態は：

配列番号22：

ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVVTALDWSWLQTE

である。

【0142】

配列番号21および22それぞれのサイズにより、融合タンパク質全体の人工的合成が可能である。配列番号21および22、または多様体またはそれらの一部の組換え合成により作製する場合は、N末端のメチオニンを含んでよい。リンカーは、機能には必要ではないが、複合体の機能を損なわない限り、別の実施形態における第1および第2の領域間にリンカーを含めてよい。その末端には、この複合体の実施形態を得るために当技術分野で公知の任意のリンカー (例えば、表2を参照のこと) を使用してよく、リンカー配列がこれら第1および第2の領域をつなぐ程度まで、配列番号21および22は、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

20

【0143】

なおさらなる実施形態では、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列 (「尾部」) をアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれにでも付加することができる。このような配列に、FLAGタグ (DYKDDDDK) (配列番号102)、mycタグ (EQKLISEEDL) (配列番号103)、Hisタグ (HHHHHH) (配列番号80)、および当業者に公知の他の同様のタグを含めてよい。このようなタグにリンカーを含めてもよいし、含めなくてもよい。さらに、ビオチン受容タンパク質 (GLNDIFEAQKIEWHE) などのリガンド (配列番号105) を活性BirAタンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトホメオドメインペプチドの第1の領域のN末端にくるのではなく精製ドメインのN末端にくることになる。図5は、HOXD12ホメオドメインがNBDカーゴペプチドに結合し、それがさらにGSリンカーによりHisタグに結合している実施形態を示す。

30

【0144】

さまざまな実施形態では、配列番号21および22またはその一部は、炎症性疾患治療の全身送達または局所送達用に製剤化され得る。局所送達の実施形態には、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 用の吸入液体または乾燥粉末製剤、結腸および／または直腸のインメント (inment) の付いた潰瘍性大腸炎またはクローン病 (炎症性腸疾患) 用の結腸浣腸製剤、ドライアイ (乾性ケラトコンジュンティヴィティス (keratoconjunctivitis))、ぶどう膜炎および強膜炎などの炎症性眼疾患用の点眼製剤、並びに乾癬および円形脱毛症などの炎症性および自己免疫性皮膚疾患用の外用軟膏およびクリーム製剤などの例が含まれる。全身投与用製剤には、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬等のような慢性炎症性疾患の治療、並びに、急性心筋梗塞 (冠動脈血栓症) および脳卒中の予防、脳卒中および心筋梗塞 (梗塞サイズ縮小および機能回復) 並びに臓器移植患者 (臓器機能の回復

40

50

）における虚血再灌流傷害の予防のための、炎症性アテローム性プラークの不安定性のような急性炎症性状態の治療を目的とした、静脈内、皮下および筋肉内注射製剤および持続的放出のための注射可能インプラント製剤を含む。NF- κ B炎症経路活性化が、例えば、結腸癌、肺癌および一部の皮膚癌において文献で広く報告されているように、特定の癌の病因および進行に関与している場合、全身投与には癌治療が含まれる。

【0145】

配列番号21（記載にある試験ではPPL-002とラベル表示）および配列番号22（記載にある試験ではPPL-003とラベル表示）を化学的に合成し、それぞれの物理的および生物学的特性を明らかにしたうえで、先に記載のある、11アミノ酸NEMO結合ドメイン（NBD）カーゴ（配列番号20）（M.J. May et al. “Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex” *Science* 289:1550-54, Sept. 1, 2000; IStrickland and S Ghosh. “Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation” *Ann. Rheum. Dis.* 65 (Suppl3) : iii75-iii82, 2006)を同一に有する2つのアンテナペディア系細胞透過性膜構成体と比較した。これらの融合ペプチドの1つは、アンテナペディアホメオドメインの17アミノ酸配列のN末端および11アミノ酸NBDペプチドをそのC末端に使用し、これを、当該試験でPPL-004とラベル表示した。アンテナペディア系構成体のもう一つは、アンテナペディアの60アミノ酸ホメオドメインおよび先と同一の11アミノ酸NBDカーゴを結合する融合ペプチドであり、これを、当該試験でPPL-001とラベル表示した。

【0146】

物理的特性：配列番号22（PPL-003）は、その溶解度および塩の相互作用において配列番号21（PPL-002）とは異なり、製剤開発用にさらに至適になる。これらの特性は、公開されているアンテナペディア系NBDペプチド（PPL-004）および別のアンテナペディア系NBDペプチドPPL-001とも異なっている。

【0147】

PPL-001、PPL-002およびPPL-004ペプチドは、水に可溶性であるが、医薬ビヒクルまたは配合物として一般に使用される緩衝剤を含有した塩に対しては溶解性を示さなかった。従来より薬事行政で使用されている10mMトリス緩衝生理食塩水（pH7.4）中で、PPL-003は被験最高濃度の5mg/mL（0.566mM）でも澄明な溶液となって可溶性であったのに対し、PPL-002（1mg/mL）は懸濁溶液となり、これはペプチドの荷電基と塩との相互作用によることが考えられる。アンテナペディア系NBDペプチド（PPL-001およびPPL-004）もまたこの緩衝生理食塩液には不溶性であった。1mM0.01%アルギニンおよび0.1%Tween20を使用する、またはトリス緩衝生理食塩水にヒスチジンを加えてクエン酸緩衝溶液を使用することでも、PPL-001、PPL-002またはPPL-004の溶解特性は改善されなかった。PPL-002およびアンテナペディア系ペプチドに比べ、PPL-003の溶解特性に違いがでることは、構造的違いを見た限りでは予測されていなかった。さらに、PPL-003のみが5mg/mLでpH7.4リン酸緩衝生理食塩液に完全溶解した。

【0148】

開示した、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメイン-NBD透過化ペプチド（融合タンパク質）の特定の実施形態を、細胞とプレインキュベーションしてから当技術分野で公知の技術を用いてエンドトキシン刺激を行い、かかる実施形態がNF- κ B活性化および腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）などのサイトカインの形成を阻害する能力を検討した。配列番号21および／または配列番号22、または、その一部であっても、その部分について、TNF- α の刺激によるNF- κ B転写活性が測定され、かつ、エンドトキシン刺激によるサイトカイン産生について試験済みである、一部を含む実施形態を使用してインビトロ試験を実施した。

【0149】

ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメイン（配列番号21および／もし

10

20

30

40

50

くは22または多様体またはその一部)に結合しているNBDカーゴペプチドの実施形態は、約50 μ M～約200 μ Mのさまざまな濃度で行ったいずれのホメオドメインのインビトロアッセイでも活性であり、TNF- α の刺激によるNF- κ Bの転写活性および／またはサイトカイン産生を公知の方法で測定して対照群と比較した。

【0150】

NF- κ Bルシフェラーゼレポーター細胞株使用時のインビトロ活性：TNF- α で刺激したヒト胎児由来腎臓細胞株(HEK293)およびエンドトキシン(LPS)で刺激したマウスのマクロファージ様細胞株(RAW264.7)を、それぞれNF- κ Bルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに使用して、NF- κ B活性化阻害を測定するインビトロアッセイにより、NBDカーゴを有する細胞透過性ペプチドの実施形態の生物活性を測定した(Park et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 integrates T cell receptor and CD28 co-receptor signaling to effect NF- κ B induction and T cell activation .Nat Immunol. 10(2):158-166, Feb. 2009)。(図8aおよび8b)。

10

【0151】

【表 4】

図 8 a、8 b および 9 の要点：

刺激なしまたは ビヒクル	エンドトキシン (LPS) またはTNF- α で刺激して いない細胞	
LPS	対照緩衝液で3時間インキュベーションしてから、エン ドトキシン (LPS) 10 ng/mL またはヒトTNF - α 10 ng/mL で4時間刺激した細胞	
変異体：200マ イクロモル	NBD変異型非活性ペプチドで3時間インキュベーシ ョンしてから、エンドトキシン (LPS) 10 ng/mL またはヒトTNF- α 10 ng/mL で4時間刺激し た細胞	10
NBD	17アミノ酸アンテナペディア系ホメオドメイン配列 およびC末端の11アミノ酸NBD配列(配列番号02 0はNBD部分)を有する市販されているペプチドで3 0時間インキュベーションしてから、エンドトキシン (LPS) 10 ng/mL またはヒトTNF- α 10 n g/mL で4時間刺激した細胞	
PPL-001	60アミノ酸アンテナペディア系ホメオドメイン配列 およびC末端の11アミノ酸NBD配列(配列番号02 0)を有するPortage Pharmaceuticals 製ペプチドで3時間イン キュベーションしてから、エンドトキシン (LPS) 10 ng/mL または ヒトTNF- α 10 ng/mL で4時間刺激した細胞	20
PPL-002 (配列番号21)	60アミノ酸ヒトHOX-C12ホメオドメイン配列 (配列番号001)およびC末端の11アミノ酸NBD 配列(配列番号020)を有するPortage Ph armaceuticals 製ペプチドで3時間イン キュベーションしてから、エンドトキシン (LPS) 1 0 ng/mL またはヒトTNF- α 10 ng/mL で4 時間刺激した細胞	30
PPL-003 (配列番号22)	60アミノ酸ヒトHOX-D12ホメオドメイン配列 (配列番号002)およびC末端の11アミノ酸NBD 配列(配列番号020)を有するPortage Ph armaceuticals 製ペプチドで3時間イン キュベーションしてから、エンドトキシン (LPS) 1 0 ng/mL またはヒトTNF- α 10 ng/mL で4 時間刺激した細胞	40

【0152】

初めの実験では、これらのペプチドをまずDMSOに溶解してからリン酸緩衝生理食塩液で希釈したうえで、NF- κ Bルシフェラーゼレポーター細胞株を含有する組織培養完全培地に付加した。これらの試験では、PPL-003は、PPL-004および同一構造を有する市販製品PPL-004と同様の活性を有することがわかった。ある試験では、NBD配列を変更してNBD標的配列に結合できないようにした対照変異型ペプチドは非活性であり、カーゴとして使用したNBD配列に対するその試験の特異的性が示された。

【0153】

すべてのペプチドについてDMSO最終濃度を1%に調整し、ヒトTNF- α の刺激による(5 ng/mL) NF- κ B活性化に対する阻害能をHEK293細胞を用いて測定

10

20

30

40

50

したところ、すべてのペプチドについて明らかな用量-反応があった。しかしながら、同じ最低濃度 50 マイクロモルで P P L - 0 0 3 は他よりも強力なようであった。図 9 は、T N F - α の刺激を受けた、ペプチドによる前処置を行っていない細胞の割合 (%) でルシフェラーゼシグナルを表している。

【0154】

げっ歯類-全身性経静脈的エンドトキシン投与モデルにおいて、ヒト H O X C 1 2 または H O X D 1 2 ホメオドメイン（配列番号 2 1 および／または 2 2）に結合している N B D カーゴペプチドを含む実施形態製剤を、以下に記載したように、マウスに全身性経静脈的 (i.v.) または腹腔内 (i.p.) に投与して前処置を行った。なお、今後の試験では、用量はマウス 20 g あたり 1 μ g から少なくとも 2,000 μ g またはそれ以上とする。複数の炎症性および抗炎症性サイトカインおよび急性期タンパク質の血清アミロイド A (S A A) の血中レベルを測定し、結果をビヒクル陰性対照群およびデキサメタゾンで前処置した陽性対照群と比較した。

【0155】

N B D カーゴ-含有細胞透過性ペプチドのインビボ活性：初めの試験は、マウスにエンドトキシン (L P S) 50 マイクログラム / k g を注射投与する 30 分前に、マウス 1 匹あたり 500 マイクログラム (μ g) (10 m g / k g) の用量のペプチド i.p. 注射またはデキサメタゾン (3 m g / k g) で前処置したマウスで実施した。ペプチドで前処置することによる、L P S に対する炎症性サイトカイン応答の阻害能力または抗炎症性サイトカイン応答の刺激能力を、L P S 注射の 2 時間後に測定した (図 10)。

【0156】

L P S 注射後 2 時間のマウスの血漿中サイトカインレベルは、N B D 含有ペプチドで処置したマウスで低下していた。(図 11 a および 11 b)。例えば、T N F - α および I P - 1 0 (C X C L 1 0) のレベルはともに P P L - 0 0 3 を用いた前処置により説得力を持って低下しており、マウスによっては、これらのサイトカインレベルがデキサメタゾン投与群と同様に低下していた。興味深いことに、P P L - 0 0 3 は I P - 1 0 の応答を低下させる能力に関しては P P L - 0 0 4 とは明らかに異なっていた。I P - 1 0 レベルは、P P L - 0 0 3 を用いた i.p. 前処置では、デキサメタゾン処置後に測定したレベルと同様レベルまで低下したのに対し、P P L - 0 0 4 の i.p. 前処置では I P - 1 0 血漿値への作用は見られなかった。特定サイトカインに対するこうした選択的作用には、P P L - 0 0 3 の炎症性疾患用治療剤としての重要な意味が含まれ得る。

【0157】

P P L - 0 0 2 および P P L - 0 0 3 の実施形態を用いた前処置で、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 0 (I L - 1 0) レベルの上昇ももたらされた。エンドトキシン (L P S) 50 マイクログラム / k g を注射投与する 30 分前に、マウス 1 匹あたり 500 マイクログラム (10 m g / k g) の用量のペプチドを i.p. および i.v. で投与した。デキサメタゾン 3 m g / k g の i.p. 投与では I L - 1 0 レベルへの作用はなかったが、P P L - 0 0 2 (配列番号 2 1) で i.p. 前処置することにより I L - 1 0 の有意な増加がもたらされた ($p < 0.01$)。P P L - 0 0 2 (配列番号 2 1) および P P L - 0 0 3 (配列番号 2 2) の実施形態で i.v. 前処置をした場合も I L - 1 0 レベルが上昇した。興味深いことに、L P S 投与後に I L - 1 0 レベルを上昇させる、こうした能力は、アンテナペディアホメオドメインの 17 アミノ酸配列 N 末端および 11 アミノ酸 N B D ペプチド C 末端を有する、公開されている N B D 細胞透過性ペプチドである P P L - 0 0 4 を用いて前処置したマウスでは見られず (図 12)、P P L - 0 0 4 前処置群とビヒクル前処置群間に検出可能な差はなかった。

【0158】

大腸菌由来組換え型 P P L - 0 0 3 の活性および薬物動態。大腸菌で作製し、前述のように精製した (配列番号 2 1 および配列番号 2 2 の上流の作製を参照のこと) 組換え型 P P L - 0 0 3 (配列番号 2 2) 実施形態を、10 mM トリス緩衝生理食塩液 (pH 7.4) に入れ腹腔内注射でマウスに投与し、配列番号 2 0 の N B D カーゴに対してアフィニティー

10

20

30

40

50

精製ウサギ抗体を用いたELISA法でPPL-003の血漿濃度を測定した。マウスに500 μ g [マイクログラム]、1,000 μ gまたは2,000 μ gのPPL-003を注射し、指定した各タイムポイントで血液を採取した(図13)。血液にEDTAで抗凝固処理をし血漿を遠心分離により分離した。PPL-003レベルをELISAで測定し、化学合成した純粋PPL-003の標準曲線を用いて計算した。血漿PPL-003濃度は投与後5分から測定可能であり、また、Cmaxは投与後約30分から測定し、投与後約240分には最低検出限界に達した(図13~14)。

【0159】

前述のように、マウスに組換え型PPL-003を投与してからLPSを投与し、LPS注射に対する複数のサイトカイン応答をLPS投与の2時間後に測定した。PPL-003投与は、LPS投与と同時、LPS投与の30分前または60分前に行った。比較のため、デキサメタゾンをLPS投与30分前に注射した。

【0160】

LPS刺激を受けた、アミロイドAタンパク質(SAA)、TNF α 、IP-10、GM-CSF、IL-6、KC(ヒトIL-8、CXCL1と同等)およびMCP-1の血漿値は、デキサメタゾンの前処置で達成されたレベルを下回るレベルまで低下したが、炎症性サイトカインのIL-10レベルは有意に上昇した。概して、最も障害が大きかったのは、投与をLPS投与30分前に行った場合であったが、SAA障害の最大障害はPPL-003とLPSを同時に注射した場合であった(図15a、15b、16aおよび16b)。SAA濃度の平均低下率は、図16aの横線上に示されている。IL-10促進およびKC抑制は、LPS注射60分前に投与した時が最大であった。(図17aおよび17b)

【0161】

図18aおよび18bは、マウスへのPPL-003注射(i.p.)を、LPS投与の60分前、30分前、およびLPS投与と同時(0分)に行った場合の、i.v.LPS(エンドトキシン)投与に対するGM-CSF応答を示す。GM-CSFの低下は、わずかな障害しか見せなかったデキサメタゾンによる前処置の場合より大きい。同等量マイクログラムではPPL-004のモル用量は、PPL-003の約3倍でありながら、同一マイクログラム用量では、PPL-003はPPL-004より強力である。

【0162】

NBDペプチド含有融合タンパク質の場合、局所送達または外用送達により、感染症感受性をもたらしかねない、望ましくない全身活性が予防されるであろう。慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの炎症性気道疾患を治療するための吸入製剤の場合、開示した、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメイン-NBD複合体または融合タンパク質の実施形態(配列番号21または22、またはその一部)の1以上の気道炎症応答阻害能の評価は、詳細な記載があるげっ歯類動物モデル(マウスおよびラット)でこれらの化合物を吸入させて前処置をし、その後、エンドトキシンを吸入させて行われることになる。具体的には、我々は、ヒトホメオドメイン-NBD融合タンパク質または複合体の実施形態の1つ以上をさまざまな濃度、例えば、約1 μ M~約115 μ Mで使用して試験を実施し、エンドトキシンによる刺激を受けたBALF中の細胞およびサイトカインの応答に対する、対応する最大障害を評価していく。さらに、配列番号21および/または22、またはその一部を含む2製剤、すなわち、(i)ネブライザーで送達する液体製剤の実施形態、および(ii)乾燥粉末製剤の実施形態を評価するため、小用量のエンドトキシン吸入を行ったヒトにおいての試験が計画されている。これらの製剤および送達系実施形態は、COPDのような炎症性気道疾患の患者に有効となる。

【0163】

げっ歯類にエンドトキシン吸入投与を行う際に吸入製剤としてマウスに投与するのは、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメイン(例えば、配列番号21および/または22、またはその一部)に結合しているNBDカーゴペプチドを含む実施形態であり、マウス1匹あたり少なくとも1 μ g~少なくとも約200 μ gまたはそれ以上の用

量で与える。気管支肺胞洗浄液（BALF）流体中のTNF- α およびIL-6濃度について、公知方法による測定、および結果と対照群との比較が行われる。

【0164】

また、げっ歯類にエンドトキシン吸入投与を行う際に吸入製剤としてマウスに投与するのは、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部（例えば、配列番号21および／または22、またはその一部）に結合しているNBDカーゴペプチドを含む別の実施形態であり、マウス1匹あたり少なくとも1 μ g～少なくとも約200 μ gまたはそれ以上の用量で与える。気管支肺胞洗浄液（BALF）の炎症細胞数について、公知方法による測定、および結果と対照群との比較が行われる。

【0165】

ヒトにエンドトキシン吸入投与を行う際の吸入製剤実施形態は、健常ボランティアに投与が行われ、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部（例えば、配列番号21および／または22、またはその一部）に結合しているNBDカーゴペプチドが、ヒト70kgにつき少なくとも1 μ g～少なくとも約600mgまたはそれ以上の用量で含まれることになる。気管支肺胞洗浄液（BALF）中のTNF- α 、IL-6、およびIL-1濃度および炎症細胞数について、公知方法による測定、および結果と対照群との比較が行われる。

【0166】

ドライアイ（乾性結膜炎）は、局所的な炎症により涙液産生が低下する医学的状态である。その極端な例では、角膜損傷が起こる。ドライアイの症状としては、灼熱感、痛み、乾燥空気または風が吹いている時の反射性の流涙などが非常に多く、軽度な例は「人工涙液」で治療する。しかし、中等度から重度の症例には、例えば、アラガン社（Allergan）製シクロスポリン点眼剤（Restasis（登録商標））のような局所の免疫抑制治療が必要である。最近、Toll様受容体（TLR）シグナル伝達の重要性が示唆されており、マウスモデルが作製された（Redfern et.al. “Toll-Like Receptor Expression and Activation in Mice with Experimental Dry Eye” that appeared in Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54(2):1554-63, Feb. 28, 2013）。初めに、我々は、実験的ドライアイ（EDE）マウスモデルで試験を実施するが、その試験では、炎症性バイオマーカーおよび病理学的変化を評価することができる。例えば、NBDペプチド含有融合タンパク質または複合体の実施形態1つ以上を局所製剤にして投与した場合に、（1）杯細胞の角膜上皮への浸潤および結膜における消失；（2）涙液分泌および（3）リンパ管新生、並びに／または（4）涙腺組織内の炎症細胞の蓄積に及ぼされる作用について評価が行われる。

【0167】

EDEげっ歯類モデルで、局所製剤とともに連日、隔日、または毎週、長期間投与するのは、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部（配列番号21および／または22、またはその一部）に結合しているNBDカーゴペプチドを含む別の実施形態であり、マウス1匹あたり少なくとも1 μ g～少なくとも約500 μ gまたはそれ以上（溶解されるかぎり）の用量で与える。涙液産生、角膜上皮への杯細胞の浸潤および結膜での杯細胞の消失について、公知方法による評価および結果と対照との比較が行われる。

【0168】

より重度のドライアイげっ歯類モデルにおいて、局所製剤とともに連日、隔日、または毎週投与されるのは、ヒトHOXC12またはHOXD2ホメオドメインまたは多様体またはその一部（例えば、配列番号21および／または22、またはその一部）に結合しているNBDカーゴペプチドを、マウス20gあたり少なくとも1 μ g～少なくとも約500 μ gまたはそれ以上（溶解されるかぎり）の用量で含む、別の実施形態である。リンパ管新生および角膜病理について、公知方法による評価および結果と対照との比較が行われる。

【0169】

ヒトにおいて、局所製剤とともに連日、隔日、または毎週投与されるのは、ヒトH O X C 1 2もしくはH O X D 1 2ホメオドメインまたは多様体またはその一部（例えば、配列番号2 1および／または2 2、またはその一部）に結合しているN B Dカーゴペプチドを、ヒト7 0 k gにつき1 μ g未満～約1 0 0 μ gの用量で含む別の実施形態であり、プラセボで治療を受けている対照被検者と比較した、正常値へ向かう涙液分泌量の変化をシルマー試験により測定する。

【0 1 7 0】

円形脱毛症は、毛髪および体毛が抜ける一般的な自己免疫性皮膚疾患である。最初は、頭皮に小さく滑らかな円形斑が1以上現れるのが普通で、進行して頭皮全体の脱毛（全頭脱毛症）または体毛の完全な脱毛（全身性脱毛症）となり得る。円形脱毛症は、人口全体の約2パーセントが罹患し、米国だけでも5 0 0万人以上が罹患している。この一般的な皮膚疾患はほとんど予測が不可能で、しかも周期的である。毛髪の再発毛または再脱毛がいつでも起こり得る上、疾患経過は人により異なる。

【0 1 7 1】

頭皮および他の脱毛領域に塗布するために適切なシャンプー剤または局所製剤に製剤化し、ヒトH O X C 1 2またはH O X D 1 2ホメオドメイン-N B D融合タンパク質の実施形態、またはそれに替わるN B Dタンパク質含有複合体の実施形態が、（1）T細胞由来のサイトカインに対する下流の炎症応答（皮膚生検による評価）、（2）脱毛、および（3）毛髪再生に与える影響について評価を行う。円形脱毛症患者のこの二重盲検試験では、脱毛の進行が同一段階にあるペア信号病変は、プラセボ（局所製剤単剤）およびヒトH O X C 1 2またはH O X D 1 2ホメオドメイン-N B Dペプチド含有製剤で治療を行う。毛髪の成長および毛包の炎症について、両病変での測定、および未治療病変での比較を行う。別の並行群間比較試験において、信号病変の脱毛および発毛および新たな病変数の測定を行い、治療群間の比較を行う。

【0 1 7 2】

円形脱毛症のげっ歯類モデル、例えば、Dundee Experimental Bald Rat（DEBR）モデル、および円形脱毛症患者において、局所製剤とともに連日、隔日、または毎週、長期投与するのは、ヒトH O X C 1 2もしくはH O X D 1 2ホメオドメインまたは多様体またはその一部（配列番号2 1および／または2 2、またはその一部）に結合しているN B Dカーゴペプチドを、約0.01 wt / vol %未満～約5 wt / vol %未満の用量で含む実施形態である。脱毛および毛髪成長を、公知の方法により治療病変と未治療病変で評価する。

【0 1 7 3】

i.v.またはi.p.製剤での投与では、記載した、ヒト遺伝子由来の透過化N B D融合タンパク質または複合体（配列番号2 1および／または2 2、またはその一部）の実施形態でげっ歯類動物に前処置をした場合の虚血再灌流傷害に対する作用について、脳卒中モデルなど詳細な記載のある動物モデルにおいて評価を行う。具体的には、公知の組織病理学的技術により、虚血再灌流傷害の指標となる壊死組織領域についてこの脳卒中モデルで調べる。

【0 1 7 4】

げっ歯類脳卒中モデルでは、虚血イベントから1時間以内に投与を開始し、6時間ごと、12時間ごとまたは連日といった間隔で1～3日間継続する）亜急性投与をi.v.またはi.p.製剤で行う際、別の実施形態は、ヒトH O X C 1 2もしくはH O X D 1 2ホメオドメインまたは多様体またはその一部（配列番号2 1および／または2 2、またはその一部）に結合しているN B Dカーゴペプチドを約0.1 mg / k g未満～約1 0 0 mg / k g未満の用量で含む。治療群での壊死した脳組織領域について、公知の組織病理学方法による評価が行われる。

【0 1 7 5】

ぶどう膜炎は、眼の一般的炎症状態である。ぶどう膜炎の種類は多く、視力を脅かす、眼の各種炎症性疾患であり得る。実験的自己免疫網膜ぶどう膜炎（EAU）はヒトぶどう

10

20

30

40

50

膜炎の動物モデルとされている。ヒトぶどう膜炎治療に使用される免疫抑制剤は、このような動物モデルにおいて有効である。さらに、HOX C 1 2およびHOX D 1 2ホメオドメイン-NBD融合タンパク質の標的であるNF- κ B炎症経路は、EAUの病因に関与しているという報告がある。その上、家族性肉芽腫性ぶどう膜炎の特殊な型であるブラウ症候群は、ヒトNOD2遺伝子の特異的変異が原因である可能性があり、NF- κ Bによる炎症に直接関連している。

【0176】

眼への局所投与として製剤化した場合のヒトHOX D 1 2ホメオドメイン-NBD融合タンパク質の実施形態を、ぶどう膜炎動物モデルでの炎症低下能について評価を行う。NOD2欠失マウスにムラミルジペプチド(MDP)の水晶体内注射をし、虹彩内で血管内応答を測定することができ、イントロヴィタル(intrvital)顕微鏡および組織学的に細胞浸潤の評価が可能である。または、局所的有効性の予備検査として、マウスにおける、LPSエンドトキシン投与で発生させた眼の炎症を低下させる融合タンパク質の能力を評価することができる。ぶどう膜炎動物モデルで有効性が示唆されれば、より一般的な種類のぶどう膜炎でヒトを対象とした臨床試験が考慮され得るだろうと予想される。ぶどう膜炎臨床試験で用いる臨床的エンドポイントには、治療16週間後の、硝子体混濁の段階のベースラインからの平均変化量および前房内細胞の段階のベースラインからの平均変化量が含まれる。悪化の予防は、ベースラインから、硝子体混濁の2段階以上の進行が観察されないこと、前房内細胞の2段階以上の進行が予防されていること、または3 log MAR以上の視力悪化が予防されていることにより示される。

【0177】

ある実施形態では、記載した、ヒト由来の透過化NBD複合体(配列番号21および/または22、またはその一部)の静脈投与用製剤を用いたヒト被検者での治療効果は、血管内血栓症および不安定狭心症をもたらすアテローム性プラークの不安定性、急性心筋梗塞、ならびに急性脳卒中の臨床経過について評価できる。不安定狭心症、急性MIおよび/または急性脳卒中の症状を呈するヒト被検者では、基礎病理は、アテローム硬化病変内のマクロファージによるプロトロンビン因子の産生をともなう炎症性のアテローム性プラークの不安定性に関連し、血栓形成および部分的または完全な血管閉塞をもたらす。具体的には、急性期医療施設の受診時から評価を開始できる。詳細な評価として、急性期および亜急性期の治療を1~5日間行い、受信後24時間のC反応性タンパク質(CRP)などの炎症バイオマーカーに与える効果の観察/測定が挙げられる。米国国立衛生研究所脳卒中スケール(National Institutes of Health Stroke Scale; NIHSS)で測定した、死亡率、心機能(急性MIの場合は駆出率)および神経学的機能(急性脳卒中の場合)などの臨床転帰を受信してから約1か月後に評価することができる。NIHSSは、脳卒中関連の神経障害を定量的に測定できる系統的評価ツールである。例えば、NIHSS値が12~14を下回る脳卒中患者は、良好または優れた転帰の可能性が80%とされ、また、NIHSS値が20~26を上回る患者は良好または優れた転帰の可能性が20%未満である。したがって、これらの試験において、1か月後のNIHSSスコアが割合17を下回るヒト被検者を神経学的機能のエンドポイントとして使用してよい。

【0178】

別の実施形態では、ヒト遺伝子由来の細胞透過化NBD複合体(配列番号21および/または22、またはその一部)を1日あたり約0.1 mg/kg~約100 mg/kg未満で連日静脈内投与する治療について評価することができる。24時間後の血清中CRP濃度の評価を公知の方法により行う。さらに、受診から1か月後に、(1) NIHSSが17未満の患者の割合により測定した脳卒中後の神経学的機能；(2) 超音波測定によるMI後の心拍量；および(3) 急性の死亡率レベルの評価を行う。結果を対照と比較する。

【0179】

配列番号1~19、または多様体またはそれらの一部、結合しているNBDペプチドを含む別の実施形態には、当技術分野で公知の任意のリンカーを1以上含んでいる、さまざ

まな融合タンパク質または複合体が含まれるが、その際、配列付加により融合タンパク質または複合体の機能が損なわれないことが条件となる。

【0180】

実施例 2

多発性嚢胞腎の PC1 細胞質内 C 末端尾部ペプチド

タンパク質-タンパク質相互作用を抑制する、ヒト HOXC12 もしくは HOXD12 ホメオドメイン（または多様体またはその一部）融合タンパク質の別の実施形態は、第2の領域がアミノ酸200からなるペプチドで構成されているもので、これにおいて、かかるペプチドの配列は、p200とも呼ばれる、PC1タンパク質の細胞質内C末端尾部領域（PC1 CTT）に由来している（Lal et al. “Polycystin-1 C-terminal tail associates with β -catenin and inhibits canonical Wnt Signaling” Hum. Mol. Genet. 17(20):3105-17, Oct. 15, 2008、補足資料を含む）。PC1遺伝子および／またはPC2遺伝子は、一般に、多発性嚢胞腎（PKD）では変異している。これらの変異は、遺伝性または体細胞変異の結果またはこれらの組み合わせによるもので、PC1タンパク質のC末端の細胞質内尾部領域から切断された転写因子により遺伝子の活性化が調節されなくなる。p200タンパク質は、この転写因子の作用を遮断するが、このタンパク質の尿細管細胞内作用部位まで有効に送達できれば、PKD患者の尿細管の発達を正常に戻すことが可能であり得る。

【0181】

ある実施形態では、第1の領域のヒト HOXC12 ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号1（表3）：

SRKKRKPYSKLQLAELEGELFVNEFITRQRRRELSDRLNLS
DQQQVKIWFQNRRMKKKRLL

である。

別の実施形態では、第1の領域のヒト HOXD12 ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号2（表3）：

ARKKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLS
DQQQVKIWFQNRRMKKKRVV

であり、それに連結している第2の領域は、PC1 CTT配列由来のp200ペプチドであり、この第2部分のアミノ酸配列は、

配列番号23（表3）：

VILRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWMGL
SKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPPPSAGSD
ASHPSTSSSQLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALL
TQFDRLNQATEDVYQLEQQQLHSLQGRRSSRAPAGSSRGPS
PGLRPALPSRLARASRGVDLATGPSRTPLRAKNKVHPSST

である。さらに他の実施形態では、第2の領域は、ここに示したカーゴ配列の変形配列である。開始因子メチオニンを付加した、HOXC12を含む融合タンパク質全体の配列の実施形態を、配列番号24として示す（表3）：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGELFVNEFITRQRRRELSDRLN
LSDQQQVKIWFQNRRMKKKRLLVILRWRYHALRGELYRPAW
EPQDYEMVELFLRRLRLWMGLSKVKEFRHKVRFEGMEPLP
SRSSRGSKVSPDVPPPSAGSDASHPSTSSSQLDGLSVSLG
RLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRLNQATEDVYQLEQQ
QLHSLQGRRSSRAPAGSSRGPSGLRPALPSRLARASRGVD
LATGPSRTPLRAKNKVHPSST

また、開始因子メチオニンを付加した、HOXD12を含む融合タンパク質全体の配列の実施形態を、配列番号25として示す（表3）：

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLSDQQVKIWFQNRMRMKKKRVVILRWRYHALRGELYRPAWE PQDYEMVELFLRRLRLWMGLSKVKEFRHKVRFEGMEPLPSRSSRGSKVSPDVPSPSAGSDASHPSTSSSSQLDGLSVSLGRLGTRCEPEPSRLQAVFEALLTQFDRNLNQATEDVYQLEQQ LHS LQGRRSSRAPAGSSSRGPSPGLRPALPSRLARASRGVD LATGPSRTPLRAKNKVHPSST。

リンカーは機能には必要ではないが、機能が損なわれなければ、配列番号1と、配列番号23もしくはその一部との間、または配列番号2と、配列番号23、もしくはその一部との間にリンカーを含めてよい。当技術分野で公知のリンカーを使用してよいが、それにより、配列番号24および25の実施形態は、リンカー配列で各複合体の第1と第2の領域がつながる程度に、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

10

【0182】

別の実施形態では、p200ペプチドは、配列番号3～19のいずれに結合してもよい。

【0183】

なおさらなる実施形態では、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端またはカルボキシ末端いずれにでも加えることができる。このような配列は、FLAGタグ(DYKDDDDK)(配列番号102)、mycタグ(EQKLISEEDL)(配列番号103)、Hisタグ(HHHHHH)(配列番号80)、および当業者に公知の他の同様のタグを含んでよい。このようなタグにリンカーを含めてもよいし、含めなくてもよい。さらに、ビオチン受容タンパク質(GLNDIFEAQKIEWHE)(配列番号105)などのリガンドを活性BirAタンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインのN末端にくるのではなく精製ドメインのN末端にくることになる。

20

【0184】

PC1CTTp200ペプチドを第2の領域に有する、60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部を含む、融合タンパク質の実施形態は、静脈内、皮下、筋肉内および注射可能な持続放出用インプラント製剤などの全身投与用製剤に含められことになる。また、これらの製剤を、糸球体でろ過されネフロンに入った後、尿細管細胞により再吸収させるか、または血液を介して腎囊胞細胞を標的にすることができるバソプレシン2受容体(V2R、下記を参照のこと)のような特異的受容体を介して標的にするような、特異構造を含むよう製剤化してもよい。このような構造を表す第3の領域は、例えば、図3を参照のこと。留意されたとおり、融合タンパク質の生物学的活性は、cyst様構造の形成が阻害されているPKD変異のある腎尿細管細胞培養のインビトロで、また、囊胞形成および腎肥大の進行が阻害されているPKDげっ歯類モデルにおいても示すことができる(Lalら、2008年)。融合タンパク質の実施形態(配列番号24もしくは25、もしくはその一部であって開始因子メチオニンを含まないもの、または、別のPC1CTTp200ペプチド含有複合体実施形態)が囊胞形成に及ぼす効果を、これらの尿細管細胞培養のインビトロで、また、PKD動物モデル(例えば、PKD1トランスジェニックマウス(Pkd2W525/-))においても評価していく。このPKD-1トランスジェニックマウスモデルでは、腎の拡大阻害(すなわち、腎肥大阻害)について超音波測定を行う。PC1CTTp200ペプチドを第2の領域に含む、融合タンパク質および/または複合体の開示実施形態のうち1以上の医薬製剤を使用するPKD患者において、総腎容積および囊胞の大きさと数の増減をMRIで評価する。

30

40

【0185】

PKDを治療するための、PC1CTTp200ペプチド含有融合タンパク質または複合体の別の実施形態では、タンパク質の第2の領域は、p200のすべてではないが一部の生物

50

学的活性を保持する、p 2 0 0 分子の一部、p 2 1 である。表 3 の配列番号 2 6 を参照のこと。p 2 1 ペプチドを上記の P K D 腎尿細管細胞培養中で遺伝子発現させると、これらの細胞に p 2 0 0 ペプチド全体を発現させた場合に似た状態で正常な管様の表現型を細胞に回復させる。p 2 1 アミノ酸を p 2 0 0 構成体から除去すると、p 2 0 0 の発現により、培養中のこれらの細胞の c y s t 様表現型を修正する機能も消失する。p 2 0 0 とは異なり、p 2 1 は W n t シグナル伝達経路を活性化しないことから、骨芽細胞の活性が誘発されない可能性がある。こうした違いは、オステオカルシンのような骨芽細胞の骨形成バイオマーカーを使用して P K D マウスモデルにおけるインビボで測定が可能であり、このモデルで、腎嚢胞形成の進行に対する有益な効果および腎の大きさを超音波で測定することも可能である。

10

【0186】

6 0 アミノ酸ヒト H O X C 1 2 ホメオドメインの第 1 の領域のアミノ酸配列（配列番号 1）は、先に示したとおりである。このドメインの第 2 の領域 p 2 1 のアミノ酸配列（配列番号 2 6）は、

I R R I R L W M G L S K V K E F R H K V R

である。さらに他の実施形態では、第 2 の領域は、ここで示したカーゴ配列の変形配列である。

【0187】

H O X C 1 2 および H O X D 1 2 を含有する融合タンパク質のような特定の実施形態で開始因子メチオニンを有するものを、下記表 3 にそれぞれ配列番号 2 7 および 2 8 で示す。

20

配列番号 2 7 :

M S R K K R K P Y S K L Q L A E L E G E F L V N E F I T R Q R R R E L S D R L N
L S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R L L I R R I R L W M G L S K V K E F R H K
V R

配列番号 2 8 :

M A R K K R K P Y T K Q Q I A E L E N E F L V N E F I N R Q K R K E L S N R L N
L S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R V V I R R I R L W M G L S K V K E F R H K
V R。

【0188】

30

リンカーは、機能には必要ではないが、例えば、配列番号 1 と 2 7 または 2 8 との間、および配列番号 2 と 2 7 または 2 8 との間に、機能を損なわせることなくリンカーを含めてよい。当技術分野で公知の任意のリンカーを使用してよいが、配列番号 2 7 および 2 8 の実施形態は、リンカー配列で第 1 と第 2 の領域がつながる程度に、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

【0189】

別の実施形態では、p 2 1 ペプチドは、配列番号 3 ~ 1 9 のいずれに結合してもよい。

【0190】

P K D - 1 トランスジェニックマウスモデルにおいて、我々は、（１）我々ヒトの H O X C 1 2 または H O X D 1 2 ホメオドメイン-p 2 0 0 の融合タンパク質または複合体の実施形態、および（２）我々ヒトの H O X C 1 2 または H O X D 1 2 ホメオドメイン-p 2 1 融合タンパク質または複合体の実施形態を含む製剤を i . p . または i . v . で長期間連日注射した場合の腎の大きさに対する効果を超音波により評価する。

40

【0191】

P K D - 1 トランスジェニックマウスモデルにおいて、P C 1 C T T カーゴペプチド（p 2 0 0 （配列番号 2 3）または p 2 1 （配列番号 2 6）いずれか）が、ヒト H O X C 1 2 または H O X D 1 2 ホメオドメイン（p 2 1 の場合は配列番号 2 7 および 2 8、また、p 2 0 0 の場合は配列番号 2 4 および 2 5）に結合している実施形態、または、リンカーの種類が異なる（リンカーがある場合）別の P C 1 C T T ペプチド含有実施形態を、マウス 1 匹あたり少なくとも約 1 μ g ~ 少なくとも 5 0 0 μ g またはそれ以上（溶解

50

されるかぎり)の用量で与える。腎の大きさおよび肥大速度を超音波で評価し、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p21治療製剤の投与を受けている群から得られた結果を、ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体の治療製剤投与を受けている群、および対照群と比較する。

【0192】

PKD-1トランスジェニックマウスモデルにおいて、我々は、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p21の融合タンパク質または複合体、およびヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体を含む別の実施形態が腎肥大を低下させる能力を対照群との比較によりさらに評価し、ヒトホメオドメイン-p21およびヒトホメオドメイン-p200双方が血液中のオステオカルシンのような骨芽細胞の骨バイオマーカーの変化に及ぼす効果を比較する。TheヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p21およびヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体の実施形態を、製剤にして、マウス1匹あたり少なくとも約1μg〜少なくとも500μgまたはそれ以上(溶解されるかぎり)の用量で投与する。オステオカルシン血中濃度を公知の方法で評価し、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p21治療製剤などの実施形態の投与を受けている群から得られた結果を、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体の治療製剤などの実施形態の投与を受けている群および対照群と比較する。

【0193】

上記製剤の長期連日投与で全身性治療を受けているPKD患者において、PC1 CTTカーゴペプチド(p200(配列番号23)またはp21(配列番号26)またはその一部のいずれか)が、ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメインまたは多様体またはその一部(例えば、p21の場合は、配列番号27〜28の完全配列実施形態または多様体またはその一部、および、p200の場合は、配列番号24〜25の完全配列実施形態または多様体またはその一部)にペプチド結合を介して結合している実施形態、または、リンカーの種類が異なる(リンカーがある場合)別のPC1 CTTペプチド含有複合体実施形態を、約0.01mg/kg未満〜約100mg/kg未満の用量で投与する。腎肥大速度を公知の方法で評価し、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン-p21治療製剤実施形態の投与を受けている群から得られた結果をヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質または複合体の治療製剤の実施形態の投与を受けている群および対照群と比較する。

【0194】

腎嚢胞を標的にする: PKDにおける嚢胞の一部または大部分は腎の集合管に最初に発生すると考えられている。集合管細胞はバソプレシン2受容体(V2R)を発現する。いくつかの実施形態にペプチドV2R拮抗因子を連結して含めるか、またはペプチドV2R拮抗因子を融合タンパク質のさらなるセグメントとして付加することにより、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメインペプチドまたは多様体またはその一部を第1の領域に有し、p200またはp21を第2の領域に有する融合タンパク質および複合体実施形態に、集合管を起源とする腎嚢胞を標的にさせることが可能であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーの付加により複合体の機能が損なわれることがなければ、除去可能なリンカーを使用してよい。非競合的ペプチドV2R拮抗因子の一例が、Rihakova, et al. "VRQ397 (CRAVKY): a novel noncompetitive V2 receptor antagonist" Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 297:R1009-R1018, 2009 ("CRAVKY" disclosed as SEQ ID NO: 29)により報告された。露出されたヒトホメオドメイン領域が一旦細胞の細胞質まで侵入を促進した後は連結解除または溶解するよう設計されたリンカーを有する、ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメイン-p200および/またはヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメイン-p21の融合(複合体)タンパク質の実施形態のN末端またはC末端に、非競合的ペプチドV2R拮抗因子であるVRQ

397 (CRAVKY) (表3に示す配列番号29)を付加する試験を行い、有効性(腎の大きさの変化など)並びに作用部位への送達効率を得るための必要用量について評価を行いたいと考えている。さらに、ペプチドV2R拮抗因子が異なる機序を介して融合タンパク質または複合体の実施形態の有効性に影響を与えるのかどうかについて調べていく。

【0195】

配列番号29(表3):ペプチドV2R 6アミノ酸拮抗因子:CRAVKY。

【0196】

さまざまな実施形態では、PKD治療のために標的としたペプチドは、以下のいずれでもよい:CRAVKY-(リンカー)-p200-ヒトホメオドメイン(配列番号29として開示した"CRAVKY");CRAVKY-(リンカー)-p21-ヒトホメオドメイン(配列番号29として開示した"CRAVKY");ヒトホメオドメイン-p200-(リンカー)-CRAVKY(配列番号29として開示した"CRAVKY");ヒトホメオドメイン-p21-(リンカー)-CRAVKY(配列番号29として開示した"CRAVKY")。このうち、最初の2つの実施例ではCRAVKY配列(配列番号29)はタンパク質のN末端にあり、残りの2つの実施例ではタンパク質のC末端にある。

【0197】

例えば、CRAVKYペプチド(配列番号29)連結の有無による、p21ペプチドおよびp200ペプチドを含む実施形態の相対活性を、上記のようにPKD嚢胞細胞培養でインビトロ評価することができる。ただし、これらの細胞は、細胞表面にV2Rを発現するようにも操作された細胞である。例えば、上記のような、記載されたさまざまなCRAVKY含有融合タンパク質(配列番号29として開示した"CRAVKY")または複合体の実施形態に対するインビトロでの用量反応は、細胞培養のインビトロ表現型をcyst様から管様に変化させる能力を、CRAVKY(配列番号29)のない、同一の融合タンパク質または複合体の実施形態と比較して行うことができる。さらに、これらの構成体を、腎の肥大を低減させる相対的な能力について上記のPKDマウスモデルで試験することもできる。

【0198】

(1)ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン-p21の融合タンパク質製剤もしくは複合体製剤の実施形態および/またはヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン-p200の融合タンパク質製剤または複合体製剤の実施形態のPKD嚢胞細胞培養における有効性が認められる場合、および(2)上記のPDK-1トランスジェニックマウスモデルにおいて、CRAVKYペプチド(配列番号29)を使用して標的とさせた場合に、より大きな効力(すなわち、用量-反応曲線の左への移動)が認められる場合は、配列番号24、25、27および/もしくは28(または多様体またはその一部)、または対応するそれらの複合体ではなく、配列番号29を含む上記の配列実施形態の少なくとも1つについて、PDK-1トランスジェニックマウスモデル並びに罹患患者で試験を行う。腎肥大速度は、公知の方法で評価される。

【0199】

配列番号1~19の任意の配列、または多様体またはそれらの一部を含み(1)p200ペプチドまたは(2)p21ペプチドに結合している実施形態など、別の実施形態には、当技術分野で公知の任意のリンカーを実施形態の機能を損なうことなく1以上含んでいるさまざまな融合タンパク質または複合体が含まれ、これらにさらにCRAVKYペプチド(配列番号29)を含めてよい。

【0200】

実施例3

リソソーム蓄積症の細胞透過性ペプチド酵素補充療法

細胞透過性ペプチドは抗体などの大きな「カーゴ(積み荷)」ペプチドまたはタンパク質が細胞に侵入できるようにすことができるという強力な証拠がある。HOX由来ペプチド、または開示に類似する、他のヒトホメオドメインの細胞透過性ペプチドを含む複合体もしくは融合タンパク質の実施形態は、大きい分子が細胞膜を通過して細胞内の作用部位

へ入るのを助ける (chaperone) ことができる。これらの実施形態は、他の場合には抗原性となるカーゴペプチドおよびタンパク質の免疫原性も低下させるため、こうしたペプチドおよびタンパク質が血液脳関門を通過して CNS へ入ることができる。したがって、開示した実施形態およびそれらの修正形態形態は、複合体または融合タンパク質の第 1 の領域がアミノ酸 60 個のヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部であり、第 2 の領域が活性酵素である実施形態も含む。これらの化合物により、リソソーム蓄積症などの先天性酵素欠損の患者の酵素機能が回復されるであろう。ここに、リソソーム蓄積症および関連「カーゴ (積み荷)」構造の 3 実施例を含めるが ((1) ゴーシェ病のための、例えば、配列番号 30 に示すグルコセレブロシダーゼ (G C a s e)、(2) ハーラー症候群のための、例えば、配列番号 45 に示すアルファ-L-イズロニダーゼ; および (3) ハンター症候群のための、例えば、配列番号 48 に示すイズロン酸-2-スルファターゼ)、他のリソソーム蓄積症において欠如しているまたは欠陥のある酵素を積んだ他の「カーゴ (積み荷)」を有するヒトホメオドメイン融合タンパク質または複合体に対しても同一の原則が適用される。

10

【0201】

リソソーム蓄積症は、一般に、主にどのような物質が関与し蓄積されるかにより分類され、大まかに以下のように分けられる: (ICD-10 コードがあるものは、併せて記載した)。

【0202】

・ (E75) 脂質蓄積症、主にスフィンゴリピドーシス (ゴーシェ病およびニーマン-ピック病 (E75.0-E75.1) を含む)、ガングリオシドーシス (テイ-サックス (E75.2) 白質ジストロフィ。

20

【0203】

・ (E76.0) ムコ多糖症 (ハンター症候群およびハーラー病を含む)

【0204】

・ (E77) 糖タンパク代謝障害

【0205】

・ (E77.0-E77.1) ムコリピドーシス

【0206】

また、糖原病 II 型 (ポンペ病) も、ICD-10 でその他の E74.0 に分類されているがリソソーム代謝障害である。

30

【0207】

ゴーシェ病

ゴーシェ病は、GBA1 遺伝子の欠如または変異が原因で起こる先天性のリソソーム蓄積障害であり、そのために GBA1 産物であるグルコセレブロシダーゼ (G C a s e) の欠損を招く。G C a s e の静脈内投与によりゴーシェ病患者の症状が一部軽減される。G C a s e の欠損はパーキンソン病の遺伝性の型の一部にも寄与する。

【0208】

ある実施形態では、第 1 の領域のヒト HOX C12 ホメオドメインの 60 アミノ酸配列は、

40

配列番号 1 (表 3):

SRKKRKPYSKLQLAELLEGELVNEF ITRQRRRELSDRLNL
SDQQVKIWFQNRRMKKKRLL

である。別の実施形態では、第 1 の領域のヒト HOX D12 ホメオドメインの 60 アミノ酸配列は、

配列番号 2 (表 3):

ARKKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEF INRQKRKELSNRLNL
SDQQVKIWFQNRRMKKKRVV

であり、

いくつかの実施形態では、それに連結する第 2 の部分は G C a s e アミノ酸配列:

50

配列番号 30 (表 3) :

ARPCIPKSFSGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRY
ESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG
FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIR
VPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIP
L IHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS
LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTA
ENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGP
TLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKY
VHGI AVHWYLD FLAPAKATLGETHRLFPNTMLFAS
EACVGSKFWEQSVRLGSDWRGMQYSHSIIITNLLYH
VVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDT
FYKQPMFYHLGHFSKF IPEGSQRVGLVASQKNDLDA
VALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFL
ETISPGYSIHTYLWRRQ

10

である。さらに他の実施形態では、第 2 の領域はここで示したカーゴ配列の変形配列である。開始因子メチオニンを付加した別の実施形態では、HOXC12を有する融合タンパク質のペプチド全体配列は

配列番号 31 (表 3) :

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELS
DRLNLSDDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLARPCIPKSF
SGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRYESTR
SGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG
FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGY
NIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPE
EDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKT
NGAVNGKGS LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAE
HKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQR
DFIARDLGP TLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAK
VVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLD FLAPAKATLGETH
RLFPNTMLFAS EACVGSKFWEQSVRLGSDWRGMQY
SHSIIITNLLYHVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFV
DSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKF IPEGSQ
RVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSK
DVPLTIKDP AVGFL ETISPGYSIHTYLWRRQ

20

30

である。開始因子メチオニンを付加したさらに別の実施形態では、HOXD12を有する融合タンパク質のペプチド全体配列は

配列番号 32 (表 3) :

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKEL
SNRLNLSDDQQVKIWFQNRMRMKKKRVVARPCIPK
SFSGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRYESTR
SGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG
FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGY
NIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPE
EDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLLASPWTSPTWLKT
NGAVNGKGS LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAE
HKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQR
DFIARDLGP TLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAK
VVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLD FLAPAKATLGETH
RLFPNTMLFAS EACVGSKFWEQSVRLGSDWRGMQY
SHSIIITNLLYHVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFV
DSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKF IPEGSQ
RVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSK
DVPLTIKDP AVGFL ETISPGYSIHTYLWRRQ

40

である。

50

【0209】

リンカーは、機能に必要というわけではないが、機能を損なわせないかぎり、特定の実施形態において、例えば、配列番号1と30の間、または配列番号2と30の間にリンカーを含めてよい。当技術分野で公知の任意のリンカーを使用してよいが、その付加により複合体の機能が損なわれないことが条件となる。配列番号31および32の実施形態、または多様体またはそれらの一部は、リンカー配列がそれぞれの第1および第2の領域をつなぐ程度まで、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

【0210】

タンパク質のグリコシル化も最終構造において改変され得る。幾つかのグリコシル化部位でマンノースが露出されると、例えば、配列番号31および／もしくは32または多様体またはそれらの一部を含む実施形態がリソソームをより優れて標的にすることができる。

10

【0211】

なおさらなる実施形態では、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端またはカルボキシ末端いずれにでも加えることができる。このような配列は、F L A G タグ (D Y K D D D D K) (配列番号102)、m y c タグ (E Q K L I S E E D L) (配列番号103)、H i s タグ (H H H H H H) (配列番号80)、および当業者に公知の他の同様のタグを含んでよい。このようなタグにリンカーを含めてもよいし、含めなくてもよい。さらに、ビオチン受容タンパク質 (G L N D I F E A Q K I E W H E) (配列番号105) などのリガンドを活性 B i r A タンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトホメオドメインまたはH O X ペプチド第1の領域のN末端にくるのではなく精製ドメインのN末端にくることになる。

20

【0212】

ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部、および、例えば、第2の領域の G C a s e 配列を含む複合体または融合タンパク質の実施形態は、静脈内、皮下、筋肉内投与および注射が可能な持続的放出用インプラント製剤などの全身投与用製剤中に含まれることになる。ヒトの変異型がマウス G C a s e 配列に組み込まれているゴーシェ病マウスモデルでは、これらの融合タンパク質は、さまざまな組織における基質の蓄積を予防し、ゴーシェ病の神経学的症状を予防する。

30

【0213】

60アミノ酸ヒトH O X C 1 2もしくはH O X D 1 2ホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質の実施形態の免疫原性を、当技術分野で周知のリンパ球増殖アッセイを用いて調べていく。例えば、60アミノ酸ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部が、他の場合には免疫原となるタンパク質の免疫原性を取り除く一般的能力を検討するため、破傷風トキシイドに免疫のある被検者から単離されたヒト単核球を、約1 μ M～約115 μ Mの範囲のさまざまな判定対象濃度のヒトホメオドメイン（または多様体またはその一部）ペプチド-破傷風トキシイド複合体または破傷風トキシイドとともにインビトロで3日間インキュベートする。その後、培養リンパ球による3H-チミジン取り込み量を測定する。

40

【0214】

さらに、酵素融合タンパク質または複合体の実施形態のインビトロでの免疫原性を評価する。具体的には、公知の輸注反応を生じ酵素に対する抗体が形成される患者から単核白血球の単離を行う。当技術分野で周知の技術を使用して、これらの細胞を、培地のみと、並びにさまざまな濃度の標準酵素製剤と、並びにさまざまな濃度のヒトH O X C 1 2もしくはH O X D 1 2ホメオドメインペプチド融合タンパク質および／または、例えば、1 μ M～約115 μ MのG C a s e 配列または多様体またはその一部のような複合体の実施形態とともに、インビトロでインキュベートを行う。リンパ球による3H-チミジンの取り込みをリンパ球免疫応答を測定して求める。

【0215】

50

例えば、融合タンパク質のインビトロ試験では、60アミノ酸ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメインまたは多様体またはその一部（例えば、配列番号24、25、27および／または28、または多様体またはそれらの一部を含む実施形態）に結合しているGC a s eカーゴペプチドを含む実施形態の評価が行われる。ある実施形態では、GC a s eペプチドを含有する、60アミノ酸ヒトホメオドメイン複合体または融合タンパク質の免疫原性と、その酵素のみの免疫原性との比較を、酵素単独で治療すると免疫介在性の公知の輸注反応を生じる患者から単離されたヒト単核白血球のリンパ球増殖アッセイを使用して行う。インビトロでのインキュベーションを判定対象とした最適マイクロモル濃度で3～5日間行う。60アミノ酸ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質を含む実施形態の免疫原性を評価し、リンパ球による3H-チミジンの取り込みを調べ、結果と対照との比較を行う。

10

【0216】

臨床試験後期には、GC a s e配列を含む、ヒトHOX C12もしくはHOX D12ホメオドメインペプチド融合タンパク質または複合体を含むさまざまな実施形態について、臨床上有意な輸注反応も、機能的に重要な抗GC a s e抗体産生も伴わずに機能を回復させる能力に基づく評価が行われる。

【0217】

細胞アッセイ実施例は2例あり、これらを使用して、ヒトホメオドメイン-GC a s e複合体実施形態の有効性、および有効濃度を測定することができる。正常細胞では、例えば、培養中線維芽細胞にGC a s eの基質を付加すると、酵素が活性化し基質（ゴーシェ病では蓄積される）が減少する。GBA1遺伝子に欠陥または欠如のある線維芽細胞では、GC a s eの基質を付加しても基質の代謝回転は起こらない。しかし、これらの細胞の培養に、露出したマンノース残基またはヒトホメオドメイン-GC a s e複合体を有する増加量のヒトホメオドメイン-GC a s eを付加することにより、より多くの酵素が細胞に送りこまれ、例えば、放射能標識した基質が減少する。あるいは、ゴーシェ病患者から採取した細胞、例えば、白血球において、蛍光ベータ-グルコシダーゼアッセイ（fluorometric beta-glucosidase assay）で疾患の診断にGC a s e相対活性を測定するが、これは、ヒトホメオドメイン-GC a s e融合タンパク質または複合体などの実施形態の酵素活性回復における有効性を示すためのヒトの細胞アッセイとしても使用できる。

20

30

【0218】

Gba1遺伝子変異のある線維芽細胞培養では、融合タンパク質としてヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン（例えば、配列番号1および／もしくは2またはその一部）に結合させたGC a s eカーゴペプチド（例えば、配列番号30）は、このインビトロアッセイにおいて約1 μM～約115 μMのさまざまな濃度で活性となる。GC a s e基質であるグリコシルセラミド（glycosylceramide）の蓄積を対照培養のものと比較して測定する。

【0219】

マウスGBA1遺伝子の点変異により信頼できるゴーシェ病モデルが作製された。このマウスモデルにおいて、ヒトホメオドメイン-GC a s e融合タンパク質または複合体を含む実施形態のi.v.またはi.p.連日投与を2か月を最高として行い、グリコシルセラミド（GC a s eの基質）の蓄積を評価する。ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメイン（例えば、配列番号1および／もしくは2またはその一部）に融合タンパク質として結合したGC a s eカーゴペプチド（例えば、配列番号30）の投与を、マウス1匹あたり少なくとも約1 μg～少なくとも約500 μgまたはそれ以上の用量で行う。再び、GC a s e基質であるグリコシルセラミドの蓄積を対照群のものと比較して評価する。

40

【0220】

中枢神経系の症状を呈する別のゴーシェ病マウスモデルでは、α-シヌクレインの蓄積およびタウ封入体が脳の領域に生じ、これらはパーキンソン病などの神経変性疾患の特徴

50

でる。例えば、マウスのGba1座位（Gba1D409V/D409V）における単一点変異の場合、 α -シヌクレイン/ユビキチン凝集体がCNSにの蓄積し、測定可能な海馬記憶障害をもたらす。このマウスモデルでは、 α -シヌクレイン/ユビキチン凝集体の脳内蓄積の抑制を目標に、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン-GCase融合タンパク質または複合体を含む実施形態が、血液脳関門を通過し、パーキンソン病の構造上の関連を予防できる酵素を送達する能力について、酵素のみを全身投与した場合と比較して評価を行う。このゴーシェ病マウスモデルでは、ヒトホメオドメイン（例えば、配列番号1～19、またはその一部）に融合タンパク質として結合したGCaseカーゴペプチド（例えば、配列番号30）を、マウス1匹あたり少なくとも約1 μ g～少なくとも約500 μ gの用量で静脈内または腹腔内に2か月を最高として投与する。脳内の α -シヌクレイン/ユビキチン凝集体の蓄積について、公知の方法により対照群のものと比較して評価を行う。

10

【0221】

配列番号1～19、または多様体またはそれらの一部のいずれでも、GCaseペプチドに結合している別の実施形態には、当技術分野で公知のリンカーを1つ以上含むさまざまな融合タンパク質または複合体が含まれるが、複合体の機能が損なわれないことが条件となる。

【0222】

ハーラー症候群

もう一つのリソソーム蓄積症であるムコ多糖症I型（MPS I）のハーラー症候群はムコ多糖症の一種で、グリコサミノグリカン（GAG）、すなわちムコ多糖類の分解に関与する、リソソームの特異的酵素の欠損に起因する遺伝性疾患の一群である。部分的に分解されたGAGが蓄積すると、細胞、組織、および臓器機能での障害が引き起こされる。ハーラー症候群は、IDUA遺伝子構造またはIDUA遺伝子調節の異常によりアルファ-L-イブロンダーゼが先天的に欠損していることによるもので、認められている臨床・病型は、主に、ハーラー（MPS IH）症候群、シャイエ（MPS IS；607016）症候群、およびハーラー-シャイエ（MPS IH/S）症候群の3つに大別され、広範な表現型を引き起こし得る。ハーラー症候群およびシャイエ症候群は、それぞれ、重症型MPS I型および軽症型MPS I型の臨床像を呈する表現型であり、ハーラー-シャイエ症候群はその中間型の表現型を発症する。

20

30

【0223】

ムコ多糖症IH型（MPS IH）は、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の尿中排泄を伴う身体的悪化の進行を特徴とするムコ多糖症I型の重症型である。MPS IHの患者は通常、生後1年以内に、肝脾腫大、骨格変形、角膜の混濁および重度の精神遅滞の組み合わせを発症する。閉塞性気道疾患、呼吸器感染症および心臓合併症は、通常、10歳前に死亡に至る。

【0224】

ムコ多糖症IH/S（MPS IH/S）は、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の尿中排泄を伴う身体的悪化の進行を特徴とするムコ多糖症I型である。MPS IH/Sは、MPS Iの臨床像の中間的な表現型を表す。神経学的症状は比較的少ないが、重症型MPS Iに記載されるほとんどの身体症状を10代前半から半ばに発症し、運動能が大幅に失われる。

40

【0225】

ムコ多糖症IS（MPS IS）は、デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸の尿中排泄を伴う身体的悪化の進行を特徴とするムコ多糖症I型の軽症型である。MPS ISの患者は、神経学的症状がほとんどまたはまったくないことがあり、身長および寿命は普通であるが、関節のこわばり、軽度の肝脾腫大、大動脈弁疾患および角膜の混濁が発症する。ここでは、我々は、これらすべての臨床表現型をハーラー症候群またはMPS Iということにする。MPS I型はMPS II型（ハンター症候群）より頻度が高く、角膜の混濁は見られず緩やかな経過をたどる（下記を参照のこと）。

50

【0226】

ある実施形態では、HOX C12 アミノ酸配列の第1の領域は配列番号1である：

SRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLN
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLL。

別の実施形態では、HOX D12 アミノ酸配列の第1の領域は配列番号2である：

ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNL
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVV。第2の領域は、例えば、配列番号45（表3）：

MRPLRPRAALLALLASLLAAPPVAPAEAPHLVHVDAARAL
WPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQNLAYVGAV 10
PHRGIKQVRTHWLLLELVTTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLDL
LRENQLLPGFELMGSSASGHFTDFEDKQQVF EWKDLVSSLA
RRYIGRYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDFFDNVSM TMQGFLN
YYDACSEGLRAASPA LR LGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRH
CHDGTNFFTGEAGVRLDYISLHRKGARSSISILEQEKVVA
QQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLVGWSLPQPWRADV TYAA
MVVKVIAQHQNLL LANTTSAFPYALLSNDNAFLSYHPHPF
AQR TLTARFQVNNTRPPHVQLLRKPVL TAMGLLALLDEEQ
LWAEVSQAGTVLDSNHTVGV LASAHRPQGPADAWRAAVLI
YASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGL 20
CSPDGEWRRLGRPVFPTAEQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPA
GGRLTLRPA LR LPSLLLVHVCA RPEKPPGQVTRLRALPL
TQGQLVLVWSDEHVGSKCLWTYEIQFSQDGKAYTPVSRKP
STFNLFFVFS PDTGAVSGSYRVRALDYWARPGPFSDPV PYL
EVPVPRGPPSPGNPの653アミノ酸アルファ-L-イズロニダーゼ配列（27
アミノ酸シグナルペプチドを含む）であり得る。さらに他の実施形態では、第2の領域は
ここで示したカーゴ配列の変形配列である。また、開始因子メチオニンを有するHOX
C12ホメオドメインを含むこの実施形態の完全配列は、例えば、配列番号46（表3）
：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFITRQRRRELSDRNLN 30
LSDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLMRPLRPRAALLALLASLLA
APPVAPAEAPHLVHVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHS
QADQYVLSWDQQNLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLLELVTT
RGSTGRGLSYNFTHLDGYLDLLRENQLLPGFELMGSSASGH
FTDFEDKQQVF EWKDLVSSLA RRYIGRYGLAHVSKWNFET
WNEPDHHDFFDNVSM TMQGFLNYYDACSEGLRAASPA LR LG
GGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRLDYI
SLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDE
ADPLVGWSLPQPWRADV TYAAMVVKVIAQHQNLL LANTTS
AFPYALLSNDNAFLSYHPHPFAQR TLTARFQVNNTRPPHV 40
QLLRKPVL TAMGLLALLDEEQ LWAEVSQAGTVLDSNHTVG
VLASAHRPQGPADAWRAAVLIYASDDTRAHPNRSVAVTLR
LRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEWRRLGRPVFPTAE
QFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLRPA LR LPSLLLVH
VCA RPEKPPGQVTRLRALPLTQGQLVLVWSDEHVGSKCL
WTYEIQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLFFVFS PDTGAVSGSY
RVRALDYWARPGPFSDPV PYLEVPVPRGPPSPGNP

であり得る。開始因子メチオニンを有するHOX D12ホメオドメインを含む別の実施
形態の完全配列は、例えば、配列番号47（表3）：

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLN 50

L S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R V V M R P L R P R A A L L A L L A S L L A
 A P P V A P A E A P H L V H V D A A R A L W P L R R F W R S T G F C P P L P H S
 Q A D Q Y V L S W D Q Q L N L A Y V G A V P H R G I K Q V R T H W L L E L V T T
 R G S T G R G L S Y N F T H L D G Y L D L L R E N Q L L P G F E L M G S A S G H
 F T D F E D K Q Q V F E W K D L V S S L A R R Y I G R Y G L A H V S K W N F E T
 W N E P D H H D F D N V S M T M Q G F L N Y Y D A C S E G L R A A S P A L R L G
 G P G D S F H T P P R S P L S W G L L R H C H D G T N F F T G E A G V R L D Y I
 S L H R K G A R S S I S I L E Q E K V V A Q Q I R Q L F P K F A D T P I Y N D E
 A D P L V G W S L P Q P W R A D V T Y A A M V V K V I A Q H Q N L L L A N T T S
 A F P Y A L L S N D N A F L S Y H P H P F A Q R T L T A R F Q V N N T R P P H V
 Q L L R K P V L T A M G L L A L L D E E Q L W A E V S Q A G T V L D S N H T V G
 V L A S A H R P Q G P A D A W R A A V L I Y A S D D T R A H P N R S V A V T L R
 L R G V P P G P G L V Y V T R Y L D N G L C S P D G E W R R L G R P V F P T A E
 Q F R R M R A A E D P V A A A P R P L P A G G R L T L R P A L R L P S L L L V H
 V C A R P E K P P G Q V T R L R A L P L T Q G Q L V L V W S D E H V G S K C L
 W T Y E I Q F S Q D G K A Y T P V S R K P S T F N L F V F S P D T G A V S G S Y
 R V R A L D Y W A R P G P F S D P V P Y L E V P V P R G P P S P G N P

であり得る。

【0227】

いくつかの実施形態では、タンパク質のグリコシル化は、最終構造においても改変され得る。幾つかのグリコシル化部位でマンノースが露出されると、アルファ-L-イズロニダーゼを含有する融合タンパク質または複合体の実施形態がリソソームをより優れて標的にすることができる。

【0228】

60アミノ酸ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部および活性アルファ-L-イズロニダーゼ酵素で構成される融合タンパク質および複合体の実施形態、または1以上のリンカーを有する、アルファ-L-イズロニダーゼを含有する融合タンパク質または複合体の代替実施形態について、これらが(1)脳組織、(2)関節軟骨内の軟骨細胞、および(3)長管骨の成長板軟骨における、(1)GAG蓄積部位に到達する能力をマウスモデルで評価する。

【0229】

ハーラー症候群MPS1-Hノックインマウスモデルは、ハーラー症候群患者で見られる変異(IDUA-W402X)に似た変異を保有しており、MPS1-Hマウスは、以前使用されていたハーラー症候群動物モデルにおける異常、およびハーラー症候群患者の中でもアルファ-L-イズロニダーゼ欠損の最も重篤な型において見られる異常と相関する、生化学的、代謝的および形態学的に異常な表現型を示す。Wang et al. "Characterization of an MPS 1-K knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation" Molecular Genetics and Metabolism 99:62-71, 2010.

【0230】

このモデルでは、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部に結合させたアルファ-L-イズロニダーゼ酵素を含む製剤実施形態、または1以上のリンカーを有する、アルファ-L-イズロニダーゼを含有する融合タンパク質または複合体の代替実施形態を、マウス1匹あたり1μg〜少なくとも500μgの用量(溶解されるかぎり)でi.v.またはi.p.注射により投与する。GAG(ヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸)の蓄積を組織病理学的技術を用いて評価し、これらの結果を対照群の結果と比較する。

【0231】

ハーラー症候群の患者において、活性アルファ-L-イズロニダーゼ酵素を含む融合タンパク質または複合体の実施形態のGAG蓄積に対する効果を、ヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸を含め、GAGの尿中排泄の低下を測定することにより評価する。具体的には、ハーラー症候群の患者に、60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメ

10

20

30

40

50

オドメインまたは多様体またはその一部に結合させたアルファ-L-イズロニダーゼ酵素を含む製剤実施形態、または1以上のリンカーを有する、アルファ-L-イズロニダーゼを含有する融合タンパク質または複合体の代替実施形態を、約0.01mg/kg未満～約100mg/kg未満の用量で長期連日投与する全身性治療を行う。GAG尿中排泄（ヘパリン硫酸およびデルマタン硫酸）を公知の方法で評価し、結果を、融合タンパク質または複合体以外の形態でアルファ-L-イズロニダーゼ酵素を含む製剤実施形態の投与を受けた患者のものと比較する。さらに、我々は、骨格および脳の発達について、成長および発育を評価する標準的な小児科技術で測定して評価する。

【0232】

ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとアルファ-L-イズロニダーゼとの融合タンパク質または複合体を含むさまざまな実施形態について、ハーラー症候群に罹患して出生した患者で生じるIDUA遺伝子のホモ接合変異を有する線維芽細胞株培養でのインビトロ試験を行う。これらの培養において、活性酵素並びにデルマタン硫酸およびヘパリン硫酸のリソソーム蓄積の減少を確認するため、融合タンパク質または複合体の実施形態を有する場合とそうでない場合のGAG代謝回転を測定する。

10

【0233】

IDUA遺伝子のホモ接合変異のある線維芽細胞培養では、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとアルファ-L-イズロニダーゼとの融合タンパク質を含む一実施形態、または1つ以上のリンカーを含む、アルファ-L-イズロニダーゼ含有の融合タンパク質もしくは複合体の代替実施形態は、このインビトロアッセイにおいて最適濃度約1μM～約115μMで活性となる。再び、GAG基質の蓄積、デルマタン硫酸およびヘパリン硫酸を測定し、その結果を対照培養と比較する。

20

【0234】

ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとアルファ-L-イズロニダーゼとの融合タンパク質または複合体の実施形態の免疫原性について、酵素補充療法中の輸注反応の記録があるMPS I患者の末梢血単核球を使用したリンパ球培養でさらに評価する。

【0235】

ある実施形態では、アルファ-L-イズロニダーゼペプチドを含有する、60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質の免疫原性と、酵素単独の免疫原性との比較を、標準的なアルファ-L-イズロニダーゼ酵素補充療法を受けた場合にアレルギー性（輸注）反応があることが知られている患者から単離されたヒト単核白血球でリンパ球増殖アッセイを使用して行う。最適酵素濃度約1μM～約115μMで3～5日間のインビトロのインキュベーションを行った後、3H-チミジンの取り込みを測定する。60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン（または多様体またはその一部）の複合体または融合タンパク質を含む実施形態の免疫原性を、リンパ球による3H-チミジンの取り込みを調べて評価し、結果を酵素単独治療群と比較する。

30

【0236】

ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインと酵素との融合タンパク質および／または複合体の実施形態の臨床における免疫原性と、標準的な酵素補充タンパク質の免疫原性との比較を、アレルギー性輸注反応の発生およびIgG抗酵素抗体産生を比較することにより行う。

40

【0237】

例えば、配列番号1～19、または多様体またはそれらの一部の任意のものをα-L-イズロニダーゼペプチドに結合させて含む別の実施形態にはさまざまな融合タンパク質または複合体の実施形態が含まれ、それらに当技術分野で公知の任意のリンカー1以上をさらに含めることができるが、その際、1以上のリンカー（複数可）を付加しても複合体の機能が損なわれないことが条件となる。

【0238】

50

ハンター症候群

ハンター症候群またはムコ多糖症Ⅱ型（MPS Ⅱ）は、リソソーム酵素のイズロン酸-2-スルファターゼの欠損に起因するまれなX連鎖劣性疾患であり、ほぼすべての細胞種、組織、および臓器にグリコサミノグリカンが徐々に蓄積されていく。MPS Ⅱ型患者では、過剰な量のコンドロイチン硫酸B（デルマトン硫酸）およびヘパリン硫酸（ヘパラン硫酸）が尿中に排泄される。MPS Ⅱ型は多系統疾患である。MPS 2の患児は重症型を呈し、骨格変形、肝脾腫大、および進行性の心肺状態の悪化を含む早期の身体異常を伴う。顕著特徴は神経学的損傷であり、発達遅滞および活動性亢進として現れるが精神遅滞および認知症へと進行する。患児は、通常、閉塞性気道疾患または心不全のため15歳までに死亡する。対照的に、MPS 2の軽症型の患児は成人期まで生存する場合があります。軽症の身体的合併症を伴い、また、精神遅滞を伴わないことが多い（Wraith, J. E. et al. “Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy” Europ. J. Pediat. 167: 267-277, 2008）。

10

【0239】

ある実施形態では、第1の領域のヒトHOXC12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号1（表3）：

SRKKRKPYSKLQLAELEGELVNEFITRQRRRELSDRLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLL

20

である。別の実施形態では、第1の領域のヒトHOXD12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号2（表3）：

ARKKKRKPYTKQQLAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVV

である。また、第2の領域は、例えば、配列番号48：

MPPPRRTGRGLLWLGVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLL
LIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQ
QAVCAPSRVSFLTGRRPDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIP
QYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHP
SSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQ
STEQAIIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK
LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALN
ISVPYGPPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDD
LQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLI
FYVPGRTASLPEAGEKLFPLYLDPFDSASQLMEPGRQSMDL
VELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPSPFHVELCREGKNLLK
HFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP
SLKDIKIMGYSI RTIDYRYTVWVGFPDEF LANFSDIHAG
ELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMPのイズロン酸-2-スル

30

ファターゼ酵素（25アミノ酸シグナル配列を含む550アミノ酸）であり得る。さらに他の実施形態では、第2の領域はここで示したカーゴ配列の変形配列である。第1の（HOXC12）と開始因子メチオニンを有する第2の領域とを組み合わせた完全なアミノ酸配列実施形態は、例えば、配列番号49：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGELVNEFITRQRRRELSDRLNLS
LSDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLMPPPRRTGRGLLWLGVLSS
VCVALGSETQANSTTDALNVLLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLVR
SPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTR
RLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHP
GISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSSEKYENTKTCRGPDGELH

40

50

ANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPF
 FLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGL
 PPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP I PVDFQRKIRQS
 YFASVS YLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAL
 GEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLF P
 YLDPFDSASQ LMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVP
 PRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRE
 LIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSI RTIDYRY
 TVWVGFNPD EFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDS
 QGGDLFQLLMP

10

である。第1の(HOX D12)と開始因子メチオニンを有する第2の領域とを組み合わせた完全なアミノ酸配列実施形態は、例えば配列番号50:

MARKKRKPYTKQQAELNEFLVNEFINRQKRKELSNRLN
 LSDQQVKIWFQNRMRMKKKRVMP PPR TGRGLLWLGLVLS S
 VCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDL RPSLGCYGDKL V
 RSPNIDQLASHSLFQNAFAQQA VCAPS RV SFLTGRRPDT
 TRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHP
 GISSNHTDDSPYSWSFPYPHPSSEKYENTKTCRGP DGE L H
 ANLLCPVDVLDVPEGTLPDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPF
 FLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGL
 PPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP I PVDFQRKIRQS
 YFASVS YLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWAL
 GEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLF P
 YLDPFDSASQ LMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVP
 PRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRE
 LIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSI RTIDYRY
 TVWVGFNPD EFLANFSDIHAGELYFVDS DPLQDHNMYNDS
 QGGDLFQLLMP

20

である。

【0240】

30

いくつかの実施形態では、タンパク質のグリコシル化は、最終構造においても改変され得る。幾つかのグリコシル化部位でマンノースが露出されると、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメインとイズロン酸-2-スルファターゼとの融合タンパク質または複合体の実施形態がリソソームをより優れて標的にすることができる。

【0241】

IDS遺伝子のホモ接合変異がある線維芽細胞培養において、ヒトHOX C12またはHOX D12ホメオドメインとイズロン酸-2-スルファターゼとの融合タンパク質のような実施形態、または1つ以上のリンカーを含む、イズロン酸-2-スルファターゼ含有の融合タンパク質または複合体の代替実施形態は、このインビトロアッセイにおいて約1 μM~約115 μMのさまざまな濃度で活性となる。再び、GAG基質の蓄積を測定し、その結果を対照培養と比較する。

40

【0242】

実験的遺伝子治療法を評価するためにすでに使用されている、MPSII型(ハンター症候群)のマウスモデル(idsy/-)において、全体的な形態学的表現型の発症は、3~4月齢で発現し、進行してさらに重症となり60~70週齢で死亡する。この表現型には、体重増加の低下、頭蓋顔面部および筋骨格系の異常が含まれ、短頭蓋および脱毛および指の肥厚を伴う。さらに、これらのマウスは、オープンフィールドテストで不規則歩行、歩行パターンの異常並びに歩行および探索能力不良を示す。このマウスモデルでのIDS活性は、野生型組織におけるこの酵素の活性と比較すると、肝臓、脾臓、肺、心臓、腎臓、骨格筋、脳および眼において検出不可能となる。しかしながら、IDSはデルマタ

50

ン硫酸およびヘパラン硫酸GAGの異化を開始する。IDS活性の喪失により生後数日ですでにGAGがすべての組織内に蓄積され始め、成人期には劇的な量の増加が見られる。これにより、細胞の空胞形成が進行し、その後の細胞死をもたらす。MPSII型マウスは3か月齢および9か月齢で、細胞内のGAG蓄積高値を示すが、X線評価で示されるように、進行性にGAGが蓄積したことにより骨格の変形も生じており、これが歩行テストの成績に影響を与えた。(Polito, VA et al. "Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery." Hum. Mol. Genet. 15(7):1225-36, April 1, 2006)。

【0243】

これらのMPSII型マウスの組織ホモジネートから調製したタンパク質抽出液中のGAG蓄積を、4-メチルウンベリフェリル- α -イズロン酸-2-スルファート(4-methylumbelliferyl- α -iduronate-2-sulfate)蛍光基質を使用して可視化し定量することによりIDS活性を調べる。これらのマウスの肝臓、脾臓、肺、心臓、腎臓および骨格筋のパラフィン包埋切片をアルシアンブルー染色することによりGAGを組織内で観察することができる。さらに、タンパク質にジメチルメチレンブルー法を使用してGAG濃度を測定する。

10

【0244】

ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン(または多様体またはその一部)に結合させたイズロン酸-2-スルファターゼペプチドを含む製剤実施形態を、Osidy/-マウスに、マウス1匹あたり1 μ g~少なくとも500 μ gまたはそれ以上(溶解されるかぎり)の用量でi.v.またはi.p.注射により投与する。組織病理学的技術を用いてGAG(ヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸)の蓄積を評価し、これらの結果を対照群のものと比較する。

20

【0245】

ハンター症候群患者において、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとイズロン酸-2-スルファターゼとの融合タンパク質または複合体を含む製剤実施形態を用いた治療による、疾患の全身症状、例えば、CNS、骨、および関節などに対する効果について、正常な発達の場合と比較して評価を行いたいと考えている。ハンター症候群患者に対し、例えば、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部に結合させたイズロン酸-2-スルファターゼ酵素を含む製剤実施形態、またはイズロン酸-2-スルファターゼ配列および1以上のリンカーを含む融合タンパク質もしくは複合体の代替実施形態を、約0.01mg/kg未満~約100mg/kg未満の用量で長期連日投与する全身性治療を行う。GAG尿中排泄(ヘパラン硫酸およびデルマタン硫酸)を公知の方法で評価し、結果を、融合タンパク質または複合体以外の形態でイズロン酸-2-スルファターゼ酵素を含む製剤の投与を受けた患者のものと比較する。さらに、骨格および脳の発達について、成長および発育を評価する標準的な小児科技術で測定して評価する。

30

【0246】

ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとイズロン酸-2-スルファターゼとの融合タンパク質または複合体の実施形態のインビトロでの免疫原性について、治療群と対照(プラセボ)群それぞれの増殖反応を比較することにより、さらなる評価を行う。リンパ球培養を、酵素補充療法中の輸注反応の記録があるMPSII患者の末梢血単核球を使用して調製する。これらの細胞を3~5日間培養した後、3H-チミジンの取り込みを測定して増殖反応を測定する。ある実施形態では、ヒトホメオドメイン-イズロン酸-2-スルファターゼペプチドを含有する、60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン(または多様体またはその一部)の複合体または融合タンパク質の免疫原性と、酵素単独の免疫原性との比較を、約1 μ M~約115 μ Mの範囲内の判定すべき最適濃度で3~5日間インビトロのインキュベーションを行った後、単離されたヒト単核白血球でのリンパ球増殖アッセイを使用して行う。60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン(または多様体またはその一部)の複合

40

50

体または融合タンパク質を含む実施形態の免疫原性は、リンパ球による3H-チミジンの取り込みを調べて評価する。

【0247】

例えば、配列番号1～19、または多様体またはそれらの一部の任意のものをイズロン酸-2-スルファターゼペプチドに結合させた別の実施形態にはさまざまな融合タンパク質または複合体が含まれ、1以上のリンカー（複数可）を付加しても複合体の機能が損なわれることがなければ当技術分野で公知の任意のリンカーを1以上含むことができる。

【0248】

実施例4

先天盲における網膜グアニル酸シクラーゼ（RetGC-1）補充療法

10

レーバー先天性黒内障1型（LCA1）：ヒトRetGC-1は、アミノ酸1103個のタンパク質であり、シグナルペプチドがなくても酵素のみをコードするアミノ酸52～1103を含む。RetGC-1は、RPE65の遺伝子産物であり、欠如または変異があると失明する。この疾患では、保存された錐体-光受容体の視力は変異体の生化学的特性と相関しており、このことは、網膜のRetGC-1酵素活性を回復させることができれば視力回復の達成が可能であることを示す。したがって、本明細書に開示する実施形態およびそれらの修正形態は、細胞透過性ペプチドである60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン（または多様体またはその一部）を含む融合タンパク質または複合体と、カーゴペプチドとしてのRetGC-1酵素とを含み、任意の数または製剤の実施形態においてこれらを定期的に眼内注射または局所投与することができる。

20

【0249】

ある実施形態では、第1の領域のヒトHOXC12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号1（表3）：

SRKKRKPYSKLQLAELLEGFLVNEFITRQRRRELSDRLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLL

である。別の実施形態では、第1の領域のヒトHOXD12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号2（表3）：

30

ARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLS
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVV

であり、連結される第2の領域は、例えば、

配列番号33（表3）：

AVFTVGVLG PWACDPIFSRARPD LAARLAAARLNRDPGLA
GGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPA
ACRPAELLAE EAGIALVPWGC PWTQAEGTTAPAVTPAADA
LYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSLSTALRARGLP
VASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPRTAVIMVMHSLVLL
GGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEA
LAALANSSQLRRRAHDAVLTTLTRHCPSEGSLVLD SLRRAQER
RELPSDLNLQQVSPLFGTIYDAVFLLARGVAE ARAAAGGR
WVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAAG
DRLFATYMLDPARGSF LSAGTRMHFPRGGSAPGPD PSCWF
DPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGAF LAHYVRHRL
LHMQMVS GPNKIIILTVD DITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSL
GARSMSDIRSGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFP GDQHI
AIRPATKTA FSKLQELRHENVALYLG LFLARGAEGPAALW
EGNLAVVSEHCTRGS LQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLI
KGI RYLHHRGV AHGRLKSRNC IVDGRFVLKITDHGHGRL L

40

50

EAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLLRDPALERRGTLAGDVFS
 LAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVSPPLCRPLV
 SMDQAPVECI LLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFKNINKG
 RKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTDR
 LLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLYFSDIVGFTT
 ISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVKVETIGDAY
 MVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEV
 PVRIRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMES
 TGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGKGA
 DTFWLVGRRGFNKP I PKPPDLQPGSSNHG I SLQEIPPERR

10

は、第2の領域はここで示したカーゴ配列の変形配列である。また、開始因子メチオニンを付加した別の実施形態では、HOX C12を含む融合タンパク質のペプチド全体配列は、例えば：

配列番号34（表3）：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGEFLVNEFI TRQRRRELS DRLN
 LSDQQVKIWFQNRMRMCKKRL LAVFTVGV LGPWACDPIFSR
 ARPDLAARLAAARLNRDPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGS
 LGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAE EAGIALVPW
 GCPWTQAE GTTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAP
 QDLWVEAGRSLS TALRARGLPVASVTSM EPLDLSGAREAL
 RKVRDGP RVTAVIMVMH SVLLGGEEQRYLLEAAEELGLTD
 GSVLFLPFDTIHYALS PGPEALAA LANS SQLRRAHDAVLT
 LTRHCPSEGSVLD SLRRAQERRELP SLDNLQQVSP LFGTI
 YDAVFL LARGVAE ARAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGF
 CGDLGGDEEPPFVL LDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFLSA
 GTRMHFPRGGSAPGPDPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGF
 LLVVG MGLAGAF LAHYVRHRL LHMQMVS GPNKI I LTVDDI
 TFLHPHGGTSRKVAQGSRSS LGARSMSDIRSGPSQHLDSP
 NIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHE
 NVALYLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGS LQDL
 LAQREIKLDWMFKSSLLLDLIKGI RYLHHRGV AHGRLKSR
 NCIVDGRFVLKITDHGHGRLL EAQKVLPEPPRAEDQLWTA
 PELLRDPALERRGTLAGDVFS LAIIMQEVVCRSAPYAMLE
 LTPEEVVQVRVSPPLCRPLVSMDQAPVECI LLMKQCWAE
 QPELRPSMDHTFDLFKNINKGRKTNIIDSMLRMLEQYSSN
 LEDLIRERTEELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTP
 VEPEYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYT
 LFDAIIGSHDVKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIA
 NMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIRIGLHSGPCVAGVV
 GTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVGILRA
 LDSGYQVELRGRTELKKGKGAEDTFWLVGRRGFNKP I PKPP
 DLQPGSSNHG I SLQEIPPERRRRKLEKARPGQFS

20

30

40

である。また、開始因子メチオニンを付加したさらに別の実施形態では、HOX D12を含む融合タンパク質のペプチド全体配列は、例えば：

配列番号35（表3）：

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLN
 LSDQQVKIWFQNRMRMCKKRVVAVFTVGV LGPWACDPIFSR
 ARPDLAARLAAARLNRDPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGS
 LGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPAELLAE EAGIALVPW

50

G C P W T Q A E G T T A P A V T P A A D A L Y A L L R A F G W A R V A L V T A P
 Q D L W V E A G R S L S T A L R A R G L P V A S V T S M E P L D L S G A R E A L
 R K V R D G P R V T A V I M V M H S V L L G G E E Q R Y L L E A A E E L G L T D
 G S L V F L P F D T I H Y A L S P G P E A L A A L A N S S Q L R R A H D A V L T
 L T R H C P S E G S V L D S L R R A Q E R R E L P S D L N L Q Q V S P L F G T I
 Y D A V F L L A R G V A E A R A A A G G R W V S G A A V A R H I R D A Q V P G F
 C G D L G G D E E P P F V L L D T D A A G D R L F A T Y M L D P A R G S F L S A
 G T R M H F P R G G S A P G P D P S C W F D P N N I C G G G L E P G L V F L G F
 L L V V G M G L A G A F L A H Y V R H R L L H M Q M V S G P N K I I L T V D D I
 T F L H P H G G T S R K V A Q G S R S S L G A R S M S D I R S G P S Q H L D S P
 N I G V Y E G D R V W L K K F P G D Q H I A I R P A T K T A F S K L Q E L R H E
 N V A L Y L G L F L A R G A E G P A A L W E G N L A V V S E H C T R G S L Q D L
 L A Q R E I K L D W M F K S S L L D L I K G I R Y L H H R G V A H G R L K S R
 N C I V D G R F V L K I T D H G H G R L L E A Q K V L P E P P R A E D Q L W T A
 P E L L R D P A L E R R G T L A G D V F S L A I I M Q E V V C R S A P Y A M L E
 L T P E E V V Q R V R S P P P L C R P L V S M D Q A P V E C I L L M K Q C W A E
 Q P E L R P S M D H T F D L F K N I N K G R K T N I I D S M L R M L E Q Y S S N
 L E D L I R E R T E E L E L E K Q K T D R L L T Q M L P P S V A E A L K T G T P
 V E P E Y F E Q V T L Y F S D I V G F T T I S A M S E P I E V V D L L N D L Y T
 L F D A I I G S H D V Y K V E T I G D A Y M V A S G L P Q R N G Q R H A A E I A
 N M S L D I L S A V G T F R M R H M P E V P V R I R I G L H S G P C V A G V V G
 L T M P R Y C L F G D T V N T A S R M E S T G L P Y R I H V N L S T V G I L R A
 L D S G Y Q V E L R G R T E L K G K G A E D T F W L V G R R G F N K P I P K P P
 D L Q P G S S N H G I S L Q E I P P E R R R K L E K A R P G Q F S

である。

【0250】

リンカーは機能に必要というわけではないが、機能を損なわせなければさまざまな実施形態において、例えば、配列番号1と33の間、または配列番号2と33の間、または多様体またはそれらの一部にリンカーを含めてよい。当技術分野で公知の任意のリンカーを使用してよいが、その付加により複合体の機能が損なわれないことが条件となる。例えば、配列番号34および／もしくは35または多様体またはそれらの一部などの実施形態は、リンカー配列で第1と第2の領域がつながる程度に、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

【0251】

なおさらなる実施形態では、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端またはカルボキシ末端いずれにでも加えることができる。このような配列は、FLAGタグ(DYKDDDDK)(配列番号102)、mycタグ(EQKLISEEDL)(配列番号103)、Hisタグ(HHHHHH)(配列番号80)、および当業者に公知の他の同様のタグを含んでよい。このようなタグにリンカーを含めてもよいし、含めなくてもよい。さらに、ビオチン受容タンパク質(GLNDIFEAQKIEWHE)などのリガンド(配列番号102)を活性BirAタンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトホメオドメインまたはHOXC12ペプチド第1の領域のN末端にくるのではなく精製ドメインのN末端にくることになる。

【0252】

通常は酵素が少ないまたは欠如している細胞内に酵素がうまく機能的移行を果たしたかどうか、例えば、HEK293細胞内の酵素の移行は、酵素の基質を与えてグアニル酸シクラーゼ活性標準的な方法で測定することにより判定することができる。グアニル酸シクラーゼ活性の上昇を示す証拠が認められた場合、それは、細胞透過化能力を有するヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインなどの実施形態がヒト細胞に機能酵素

を送達することができるという実験的証拠として捉えられるであろう。

【0253】

例えば、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとRetGC-1酵素との融合タンパク質または複合体を含む実施形態をノックアウトマウスモデルで評価する。LCA1に最も近い動物モデルは、RetGC-1をコードする遺伝子Gucy2eをノックアウトさせたマウスである。このマウスは、錐体光受容体の無反応を示し、LCA1表現型を示す。Jacobson et al. "Determining consequences of retinal membrane guanylyl cyclase (RetGC1) deficiency in human Leber congenital amaurosis en route to therapy: residual cone-photoreceptor vision correlates with biochemical properties of the mutants." Human Molecular Genetics 22(1):168-83, 2013.

10

【0254】

ヒトホメオドメインとRetGC-1との複合体または融合タンパク質の実施形態を網膜（球後）注射または点眼剤（すなわち、局所投与）によりノックアウトマウスに投与し、網膜電図（ERG）に見る機能回復を視力の戻りとして評価する。結果を、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメイン-RetGC-1を含まない緩衝液を投与した対照群のものと比較する。ある実施形態では、マウスに、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部に結合させたRetGC-1ペプチドを含む製剤、または1つ以上のリンカーを含んだ、融合タンパク質または複合体を含むRetGC-1の代替実施形態を、マウス20gあたり少なくとも約1μg〜少なくとも約500μgの用量で、網膜（球後）注射または点眼剤によりタンパク質を投与する。ERGで見た機能の回復について、未治療の対照群と比較して調べる。

20

【0255】

レーバー先天性黒内障1型（LCA1）の患児において、視力および網膜電図機能の変化について、ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメインまたは多様体またはその一部に結合させたRetGC-1ペプチドを含む眼科用製剤の実施形態、またはRetGC-1配列および1以上のリンカーを含む融合タンパク質もしくは複合体の代替実施形態を、約0.01mg/kg未満〜約100mg/kg未満の用量で用いて長期間（連日、隔日、週2回、毎週またはそれ以下の頻度）治療した後、評価する。1日、3日、1週間、2週間、3週間または4週間またはそれ以上など、さまざまな治療期間経過後、融合タンパク質または複合体の治療を受けた患者を、それぞれの治療前の値と比較し、非限定的にERG機能などの視力評価用の標準的臨床方法を使用して視機能に臨床上意義のある改善が見られたかどうか評価する。

30

【0256】

配列番号1〜19、または多様体またはそれらの一部の任意のものをRetGC-1ペプチドに結合させてを含む別の実施形態には、当技術分野で公知の任意のリンカーを1以上含むさまざまな融合タンパク質または複合体が含まれるが、リンカーを付加しても複合体の機能が損なわれないことが条件となる。

【0257】

実施例5

ハンチントン舞踏病（HD）のための調節ペプチド

40

ハンチントン舞踏病（HD）は、筋協調に障害を与え認知力低下をもたらす遺伝性神経変性疾患であり、変異型ハンチンチン遺伝子（HTT）の発現により引き起こされる。30代半ばから40代前半にかけて発現することが多いが、早期に身体的および精神的能力の経時的低下を伴う場合があり、徐々に協調運動が非常に困難になる。臨床的には、眼球運動、発話および認知力の問題を含むわずかな障害もHD患者で多数観察されている。変異型HTTの発現は、脳の一部であり運動を制御する線条体に特異的であり、線条体での神経細胞の消失および／または炎症がHDの臨床徴候の根底にあると考えられる。

【0258】

ZF6xHunt-Kox-1は、長いCAGリピートを結合し変異型HTT遺伝子の発現を抑制する、特別設計のジンクフィンガータンパク質である。ZF12xHunt-K

50

ox-1およびZF18xHunt-Kox-1などの他の長さのジンクフィンガータンパク質も可能であるが、これらに限定されない。細胞透過性ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインペプチドを有する融合タンパク質もしくは複合体の実施形態により、ZF6xHunt-Kox-1、ZF12xHunt-Kox-1、ZF18xHunt-Kox-1、および関連タンパク質が細胞および核に侵入し有効かつ選択的に変異型HTT遺伝子発現を下方制御することが可能となる。60アミノ酸ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとジンクフィンガーとの融合タンパク質または複合体を含むさまざまな実施形態の神経学的病理に対する効果を評価する。このために、ハンチントン舞蹈病患者にヒトホメオドメイン-ジンクフィンガー実施形態を含む静脈投与用製剤の投与を行う。具体的には、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインペプチドが血液脳関門を通過して中枢神経系へ入る能力の評価を行う。

10

【0259】

ある実施形態では、第1の領域のヒトHOXC12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号1(表3)：

SRKKRKPYSKLQLAELEGELVNEFITRQRRRELSDRLNLS
DQQVKIWFQNRMRMKKKRLL

である。別の実施形態では、第1の領域のヒトHOXD12ホメオドメインの60アミノ酸配列は、

配列番号2(表3)：

ARKKRKPYTKQQLAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNLS
DQQVKIWFQNRMRMKKKRVV

であり、

連結される第2の領域は、例えば、ZF6xHunt-Kox-1配列；

配列番号36(表3)：

TGAERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEEKPFACDIC
GRKFAQRATLQRHTKIHGTGSERPFCRICMRNFSQRATLQ
RHIRTHTGEEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHGTGSERP
FQCRI CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEEKPFACDICGRKFAQ
RATLQRHTKIHRLRQKDGSGSGSGSGSGSLVSSLSLPQ
HSAVTQGGIIKNKEGMDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDFTRE
EWKLLDTAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRL
EKGEE PWLVERE IHQETHP DSE TAFEIKSSV

30

である。さらに他の実施形態では、第2の領域はここで示したカーゴ配列の変形配列である。また、開始因子メチオニンを付加した別の実施形態では、HOXC12ペプチドを含む融合タンパク質のペプチド全体配列は、例えば：

配列番号37(表3)：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGELVNEFITRQRRRELSDRLN
LSDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLTGAERPFCRICMRNFSQR
ATLQRHIRTHTGEEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHGT
SERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIHGTGSERPFCRICMRNFSQRATLQRH
IRTHTGEEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIHRLRQKDG
SGSGSGSGSGSGSLVSSLSLPQHSAVTQGGIIKNKEGMDAK
SLTAWSR TLVTFKDV FVDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVML
ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEE PWLVERE IHQETHP
DSE TAFEIKSSV

40

であり、開始因子メチオニンを付加したさらに別の実施形態では、HOXD12ペプチドを含む融合タンパク質のペプチド全体配列は、例えば：

配列番号38(表3)：

50

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLN
 LSDQQVKIWFQNRMRMKKKRVVTGAERPFCRICMRNFSQR
 ATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
 KFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRH
 IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 LRGKDDGGG
 GSGGGGSGGGGSSQLVSSLS
 PQHSAVTQGGIIKNKEGMDAKS
 LTAWSRTLVTFKDVFVDF
 TREEWKLLDTAQQIVYRNVMLE
 NYKNLVS
 LGYQLTKPDVILRL
 LEKGEE
 PWLVEREIHQETHP
 DSE
 TAFEIKSSV

10

である。

【0260】

さらなる実施形態（複数可）では、それぞれ12および18の繰り返しを有するこれらの第2の構成要素の実施例に示すように、ジンクフィンガーの繰り返しをさらに増やして含めてよい。

【0261】

ZF12xHunt-Kox-1、例えば：

配列番号39（表3）：

TGAERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDIC
 GRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQ
 RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERP
 FQCRI
 CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
 RATLQRHTKIH
 LRGKDDGGG
 GSGGGGSSQLVGTAERP
 FQCRI
 CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
 RATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRT
 HTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRIC
 MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQR
 HTKIH
 LRGKDDGGG
 GSGGGGSSQLVSSLS
 PQHSAVTQ
 GIIKNKEGMDAKSLT
 AWSRTLVTFKDVFVDF
 TREEWKLLD
 TAQQIVYRNVMLE
 NYKNLVS
 LGYQLTKPDVILRL
 LEKGEE
 PWLVEREIHQETHP
 DSE
 TAFEIKSSV

20

30

【0262】

ZF18xHunt-Kox-1、例えば：

配列番号42（表3）：

TGAERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDIC
 GRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQ
 RHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERP
 FQCRI
 CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
 RATLQRHTKIH
 LRGKDDGGG
 GSGGGGSSQLVGTAERP
 FQCRI
 CMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ
 RATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRT
 HTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRIC
 MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQR
 HTKIH
 LRGKDDGGG
 GSGGGGSSQLVGTAERPFCRIC
 MRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQR
 HTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPF
 ACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 TGSERPFCRICMRNFSQ
 RATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
 L
 RQKDDGGG
 GSGGGGSSQLVSSLS
 PQHSAVTQGGIIKNK
 EGMDAKSLT
 AWSRTLVTFKDVFVDF
 TREEWKLLDTAQQIV

40

50

Y R N V M L E N Y K N L V S L G Y Q L T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E
I H Q E T H P D S E T A F E I K S S V

【0263】

さらなる実施形態では、ジンクフィンガーの繰り返しを増やしたこれらの配列を、例えば、開始因子メチオニン残基のついた配列を含む実施形態に含まれているヒトホメオドメインペプチドとともに示す。

【0264】

ヒトHOX C12-ZF12xHunt-Kox-1、例えば：
配列番号40（表3）：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGFLVNEFITRQRRRELSDRNL 10
LSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTGAERPFCRICMRNFSQR
ATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRH
IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
L R Q K D G G G
G S G G G G S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H
I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q
C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A
T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G 20
S G G G G S Q L V S S L S P Q H S A V T Q G I I K N K E G M D A K S L T A W S R
T L V T F K D V F V D F T R E E W K L L D T A Q Q I V Y R N V M L E N Y K N L V
S L G Y Q L T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E I H Q E T H P D S E T A F
E I K S S V

【0265】

ヒトHOX D12-ZF12xHunt-Kox-1、例えば：
配列番号41（表3）：

MARKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLN
LSDQQVKIWFQNRRMKKKRVVTGAERPFCRICMRNFSQR
ATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRH
IRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
L R Q K D G G G
G S G G G G S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H
I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q
C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A
T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G 30
S G G G G S Q L V S S L S P Q H S A V T Q G I I K N K E G M D A K S L T A W S R
T L V T F K D V F V D F T R E E W K L L D T A Q Q I V Y R N V M L E N Y K N L V
S L G Y Q L T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E I H Q E T H P D S E T A F
E I K S S V

【0266】

ヒトHOX C12-ZF18xHunt-Kox-1、例えば：
配列番号43（表3）：

MSRKKRKPYSKLQLAELEGFLVNEFITRQRRRELSDRNL
LSDQQVKIWFQNRRMKKKRLLTGAERPFCRICMRNFSQR
ATLQRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRHIRTHTGEKPFACDICGR
KFAQRATLQRHTKIH
TGSERPFCRICMRNFSQRATLQRH 50

I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G
 G S G G G G S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H
 I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q
 C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A
 T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
 E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G
 S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
 E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R
 N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T
 K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C
 D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G S G G G G S
 Q L V S S L S P Q H S A V T Q G I I K N K E G M D A K S L T A W S R T L V T F K
 D V F V D F T R E E W K L L D T A Q Q I V Y R N V M L E N Y K N L V S L G Y Q L
 T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E I H Q E T H P D S E T A F E I K S S V
 【0267】

10

ヒトHOX D12-ZF18xHunt-Kox-1、例えば：

配列番号44（表3）：

M A R K K R K P Y T K Q Q I A E L E N E F L V N E F I N R Q K R K E L S N R L N
 L S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R V V T G A E R P F Q C R I C M R N F S Q R
 A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G
 S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R
 K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H
 I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G
 G S G G G G S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H
 I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q
 C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A
 T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
 E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G
 S G G G G S Q L V G T A E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G
 E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H T G S E R P F Q C R I C M R
 N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C D I C G R K F A Q R A T L Q R H T
 K I H T G S E R P F Q C R I C M R N F S Q R A T L Q R H I R T H T G E K P F A C
 D I C G R K F A Q R A T L Q R H T K I H L R Q K D G G G G S G G G G S G G G G S
 Q L V S S L S P Q H S A V T Q G I I K N K E G M D A K S L T A W S R T L V T F K
 D V F V D F T R E E W K L L D T A Q Q I V Y R N V M L E N Y K N L V S L G Y Q L
 T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E I H Q E T H P D S E T A F E I K S S V
 【0268】

20

30

別の実施形態では、第2の領域は、上記のカーゴ配列のいずれの変形配列であってもよい。

【0269】

40

リンカーは機能に必要というわけではないが、機能を損なわせなければさまざまな実施形態において、例えば、配列番号1と36、39、または42との間、または配列番号2と36、39、または42との間、またはその一部にリンカーを含めてよい。当技術分野で公知の任意のリンカーを使用してよいが、その付加により複合体の機能が損なわれないことが条件となる。例えば、表2を参照のこと。配列番号37、38、40、41、43および／または44などの実施形態は、リンカー配列で第1と第2の領域がつながる程度に、少なくとも一部、改変されることが考えられる。

【0270】

なおさらなる実施形態では、精製を行いやすくするために、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端またはカルボキシ末端いずれにでも加えることができる。このような配列は、F

50

LAGタグ(DYKDDDDK)(配列番号102)、mycタグ(EQKLISEEDL)(配列番号103)、Hisタグ(HHHHHH)(配列番号80)、および当業者に公知の他の同様のタグを含んでよい。さらに、ビオチン受容タンパク質(GLNDIFEAQKIEWHE)(配列番号105)などのリガンドを活性BirAタンパク質とともに使用してよい。N末端を開始するメチオニンを含む配列については、N末端精製ドメインを付加した場合は、メチオニンは、ヒトホメオドメインまたはHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとジンクフィンガーとの融合タンパク質または複合体の実施形態について、構成体が機能的に移行すること、および変異型HTT遺伝子が抑制されることを測定するため、適切な細胞株で試験を行う。マウスHTT遺伝子の第1エクソンを、111CAGリピート(STHdhQ111/HdhQ111またはSTHdhQ7/HdhQ111)を有するヒトエクソンで置換したSTHdhノックイン細胞を使用する。

10

【0271】

ある実施形態では、融合タンパク質または複合体を含有する60アミノ酸ヒトHOXC12もしくはHOXD12ホメオドメイン(または多様体またはその一部)を用いたジンクフィンガーカーゴタンパク質の移行について、STHdhノックイン細胞を、最適マイクロモル濃度の判定対象と考えられる約1μM〜約115μMで1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、または24時間などのさまざまな期間インキュベーションした後の培養中のジンクフィンガーカーゴタンパク質の存在を調べる。変異型HTT遺伝子の発現を公知の方法により評価し、結果と対照培養と比較する。

20

【0272】

R6/2マウスは、最も広く使用されているHD動物モデルである。このHDノックインマウスモデルは、ヒト患者で障害が知られている脳内部位、線条体でヒトHTT遺伝子を過剰発現する。R6/2マウスは、HD患者の徴候および症状に似た運動障害を表現型として示し、例えば、R6/2マウスは前足の爪で物をとる能力が欠如している。

【0273】

ある実施形態では、3〜4週齢以降に、R6/2マウスの運動技能の評価を行う。半数を治療群、残りの半数を対照群とする。マウスには、例えば、配列番号37、38、40、41、42、もしくは43の任意の配列、またはその任意の一部を含んだ、ヒトHOXC12またはHOXD12ホメオドメインとジンクフィンガーとの融合タンパク質または複合体の実施形態の製剤を、i.v.またはi.p.注射により連日、隔日または3日おきに1〜2週間投与する。4〜6週齢時、運動技能を再度評価し、直後に組織学的解析のために屠殺する。組織学的解析は2部に分けて行われる。第1部では、rtPCRを使用して、治療群および対照群のマウスそれぞれの線条体での変異型HTTの発現を評価する。第2部では、線条体神経細胞の消失の証拠について治療群と未治療対照群のマウスの線条体を評価する。神経細胞の消失および/または線条体細胞容積の減少について、神経組織学(neurohistology)研究機関で周知の技術を用いて評価し、一般倍率での顕微鏡標準視野あたりの神経細胞密度として報告を行う。したがって、変異型HTT遺伝子の発現と、脳の線条体における神経細胞消失証拠の双方を公知の方法で評価し、運動障害の評価を行ってから、治療を受けたR6/2マウスと未治療R6/2対照群マウスの結果を比較する。また、各群の治療後の運動障害スコアをそれぞれのベースラインスコアとさらに比較する。

30

40

【0274】

ハンチントン舞踏病患者の臨床試験では、HD治療臨床試験で患者の評価に使用される臨床ツールであるハンチントン病統一評価尺度(UHDRS)の合計運動スコアを使用して運動障害の評価が行われる。このスコアによりHDにおける治療利益の定量的評価が得られ、多数の運動障害に基づいた複合スコアが得られる。ハンチントン研究グループ(Huntington Study Group)著者ら、"Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and Consistency" Movement Disorders 11(2):136-142, 1996。治療前後の全体的

50

な運動スコア変化が1ポイント以上であれば臨床上有意であるとみなされる。

【0275】

ヒトH O X C 1 2またはH O X D 1 2ホメオドメインとジンクフィンガーとの融合タンパク質または複合体を含む製剤実施形態を投与後のH D患者の運動技能変化への反映で疾患の進行を評価する。例えば、配列番号37、38、40、41、42、もしくは43、またはその一部の任意の配列。まず、これらの患者のこの治療群のU H D R Sスコアを評価し、次いで、6～8週間にわたり、融合タンパク質製剤または複合体の製剤実施形態を、体重1 k gあたり少なくとも0.01 m g～少なくとも約500 m gの範囲を判定対象の最適用量として静脈内または皮下注射で連日投与する。運動機能のほか、評価を行った他のH D障害について、ハンチントン病統一評価尺度（U H D R S）の合計運動スコアに基づいて治療後に評価し、結果をベースラインスコアと比較する。U H D R Sを、未治療対照群または同時期の既存対照に対する改善割合について評価する。

10

【0276】

配列番号1～19、または多様体またはそれらの一部の任意の配列を、先に述べた任意のジンクフィンガーペプチドに結合させて含む別の実施形態には、当技術分野で公知の任意のリンカーを1以上含んだ、さまざまな融合タンパク質または複合体が含まれるが、その際、リンカーを付加しても複合体の機能が損なわれないことが条件となる。

【0277】

実施例6

細胞膜透過性ペプチドおよびワクチン用途、細胞膜透過性ペプチド（C P P）は、樹状細胞などの抗原提示細胞の細胞質内への抗原エピトープの送達を促進して、C D 8およびC D 4それぞれのT細胞に依存的に、対応する主要組織適合複合体（M H C）クラスIまたはクラスIIにおける抗原プロセッシングと抗原提示を可能にし、有効な免疫応答を引き起こすことが示されている（Brooks, et al. Cell-penetrating peptides: Application in vaccine delivery, Biochimica et Biophysica Acta 1805:25-34, 2010）。抗原エピトープとの結合にフリン感受性リンカーを使用するC P Pは、C p Gモチーフ含有オリゴデオキシヌクレオチドとともに投与した場合にC D 8 T細胞の抗原特異的な細胞傷害性応答を誘発するうえで有効であることが示されている（Lu et al. TAP-independent presentation of CTL epitopes by Trojan antigens, J. Immunol. 166:7063-7071, 2001.）。抗原性カーゴを抗原提示細胞に放出させることができる他の結合方法には、細胞質グルタチオンで開裂されるジスルフィド結合の使用（Kim et al. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide, J. Immunol. 159:1666-68, 1997）、およびスルホスクシンイミジル4-マレイミドメチルシクロヘキサンカルボン酸（S M C C）（sulfosuccinimidyl 4-maleimidomethylcyclohexanecarboxylate）で処理した後にC末端をシステイン修飾したC P Pと反応させた抗原ペプチドの使用が挙げられる（Apostolopoulos et.al. Delivery of tumor associated antigens to antigen presenting cells using penetratin induces potent immune responses, Vaccine 24:3191-202, 2006）。リンカーを持たないC P P融合タンパク質も、腫瘍抗原に対する特異的なT細胞応答を発生させるために使用され成功している（Batchu et.al. Protein transduction of dendritic cells for NY-ESO-1-based immunotherapy of myeloma, Cancer Res. 65:10041-49, 2005、Scheller et.al. Human cytomegalovirus protein pp65: an efficient protein carrier system into human dendritic cells, Gene Ther. 15:318-325, 2008、Viehl et.al. Tat mammaglobin fusion protein transduced dendritic cells stimulate mammaglobin-specific CD4 and CD8 T cells, Breast Cancer Res. Treat. 91:271-78, 2005）。

20

30

40

【0278】

従来より、ワクチンはアジュバントに依存しており、抗原に樹状細胞を標的とさせて免疫応答を増強させるためt o l l様受容体（T L R s）のリガンドであることが多い。結核予防または転帰改善のためのワクチンの場合はこの方法ではうまくいっていない。おそらく理由の1つには、M H CクラスII依存性である抗原提示がT L R 2依存的に阻害さ

50

れることがあり、これがマクロファージ内のマイコバクテリア感染を持続させる重要なメカニズムであることも報告されている (Harding, C.V and Boom, W.H., Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a roll for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol.* 8(4):296-307, 2010)。このことから、細胞膜透過性ペプチドを使用することにより、樹状細胞の効率的な抗原プロセッシングおよび抗原提示が促進され、TLR2作動薬のこうした望ましくない作動作用が回避される可能性があり、そうした作動薬にはアデノウイルスベクターに依存するワクチンなど現在の結核ワクチンの多くが該当するが (Appledorn et.al. Adenovirus Vector-Induced Innate Inflammatory Mediators, MAPK Signaling, As Well As Adaptive Immune Responses Are Dependent upon Both TLR2 and TLR9 In Vivo. *J Immunol* 181:2134-44, 2008) アジュバントは該当しない (Frick, M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline, June 2013 <http://www.pipeline-report.org/2013/tb-vaccine> and Rowland, R. and McShane. *Expert Rev Vaccines* 10(5):645-58, 2011)。

10

【0279】

あるワクチン実施形態では、複合体は、例えば、配列番号1～19または多様体またはその一部に記載の任意の配列を有する、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部を含む第1の領域を、かかる第1の領域と非人工的には会合していない第2の領域に結合させて含み、これにおいて、前記第2の領域がペプチド抗原または抗原エピトープである抗原の一部である。さまざまな実施形態では、結合は、融合タンパク質 (ペプチド結合) としての結合であるか、またはフリン感受性リンカー (RVKR) (配列番号117) などのリンカー、ジスルフィド結合、もしくは当技術分野で公知の他の種類のタンパク質間結合を使用してよい。

20

【0280】

結核ワクチン抗原85Aおよびそのエピトープ. 抗原85複合体は、マイコバクテリアで主に分泌される極めて類似した幾つかのタンパク質をコードする多重遺伝子族である。シグナルペプチドは成熟したAg85タンパク質で開裂する。Ag85Aは、アミノ酸338個からなる分子量35.7kDa、予測pI値6.5のペプチドである。細胞外 α -抗原とも呼ばれ、細胞壁合成において重要なmycolyl transferase活性を有する。組換え型アデノウイルスベクター、組換え型Ag85Aそのものまたは重複15merペプチドセットを使用してマウスの経鼻および全身免疫化を行った後 (単一Balb/c H-2D拘束エピトープ)、Balb/cマウスにおける低分子ペプチドエピトープの免疫原性および防御活性についての解析 (Tchilian et. al. Immunization with different formulations of Mycobacterium tuberculosis antigen 85A induces immune responses with different specificity and protective efficacy. *Vaccine* 31:4624-31, 2013) では、経鼻の免疫化後の結核菌 (Mtb) 投与に対する優れた防御が示された。CD4⁺ 85A99-118およびCD8⁺ 85A70-78の応答は防御的であったがCD8⁺ 85A145-152に対する応答は防御的ではなかった。

30

【0281】

乳児におけるBCGワクチンの有効性を高めるための、アデノウイルスAg85Aワクチンを用いたヒトワクチン臨床試験では、わずかな免疫応答しか誘導されず、臨床的有效性はなかった (Tameris et.al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet* 381:1021-1028, 2013)。これは、免疫応答を下方制御するIL-10応答を誘発することが示されているアデノウイルス成分がもつTLR2作動特性の抑制作用のため、またはいくつかのAg85Aエピトープに対する非防御的応答のためである可能性がある。

40

【0282】

結核ワクチン. 防御的ヒト結核ワクチンの現在の実施形態は、複合体または複合体混合物を吸入、経鼻または非経口的注射経路で投与するものである。ある実施形態では、吸入経路により肺の局所免疫が提供される。

50

【0283】

Balb/cマウスでは、複合体または複合体混合物が、第1の領域である、配列番号1～19または多様体またはその一部のいずれかに記載の配列を含むが、これらに限定されない、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部が、かかる第1の領域と非人工的には会合していない第2の領域に結合して構成されているという概念について検討する。ある実施形態では、第2の領域は、Ag85A99-118エピトープ全体に広がる4ペプチドのうち1以上のペプチドである（表3を参照のこと）：

Ag85A99-118エピトープの4ペプチドうちの1ペプチドは配列番号51：
E T F L T S E L P G W L Q A N

であり；

Ag85A99-118エピトープの4ペプチドうちの2ペプチドは配列番号54：
S E L P G W L Q A N R H V K P

であり；

Ag85A99-118エピトープの4ペプチドうちの3ペプチドは配列番号57：
W L Q A N R H V K P T G S A V

であり；

Ag85A99-118エピトープの4ペプチドうちの4ペプチドは配列番号60：
R H V K P T G S A V V G L S M

である。さらに他の実施形態では、第2の領域は、これらの4ペプチドのうちの1以上についての変形ペプチドである。これらの複合体の幾つかの配列番号を表3に示す。例えば、ある実施形態では、第1の領域（HOX C12）および第2の領域の配列番号51を組み合わせた、Ag85A99-118エピトープの完全アミノ酸配列は配列番号52：

S R K K R K P Y S K L Q L A E L E G E F L V N E F I T R Q R R R E L S D R L N L
S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R L L E T F L T S E L P G W L Q A N

である。同様に、別の実施形態では、第1の領域（HOX D12）および第2の領域の配列番号51を組み合わせた、Ag85A99-118エピトープの完全アミノ酸配列は配列番号53：

A R K K R K P Y T K Q Q I A E L E N E F L V N E F I N R Q K R K E L S N R L N L
S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R V V E T F L T S E L P G W L Q A N

である。

【0284】

Balb/cマウスで試験を行うための第2の複合体または複合体混合物は、第1の領域である、配列番号1～19のいずれかに記載の配列または多様体またはその一部を有する、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部を、かかる第1の領域と非人工的には会合していない第2の領域に結合させて構成されている。ある実施形態では、第2の領域は、Ag85A70-78エピトープ全体に広がる3ペプチドのうち1以上のペプチドである（表3を参照のこと）：

Ag85A70-78エピトープの3ペプチドのうちの1ペプチドは配列番号63：
Q S G L S V V M P V G G Q S S

であり；

Ag85A70-78エピトープの3ペプチドのうちの2ペプチドは配列番号66：
V V M P V G G Q S S F Y S D W

であり；

Ag85A70-78エピトープの3ペプチドのうちの3ペプチドは配列番号69：
G G Q S S F Y S D W Y Q P A C

である。さらに他の実施形態では、第2の領域は、これらの3つのペプチドのうちの1以上についての変形ペプチドである。これらの複合体の幾つかの配列番号も表3に示す。例えば、ある実施形態では、第1の領域（HOX C12）および第2の領域の配列番号63を組み合わせた、Ag85A70-78エピトープの完全アミノ酸配列は配列番号64

：

SRKKRKPYSKLQLAELEGFLVNEFITRQRRRELSDRNL
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRLLQSGLSVVMPVGGQSS

である。同様に、別の実施形態では、第1の領域(HOX D12)および第2の領域の配列番号63を組み合わせた、Ag85A70-78エピトープの完全アミノ酸配列は配列番号65:

ARKKKRKPYTKQQIAELENEFLVNEFINRQKRKELSNRLNL
SDQQVKIWFQNRMRMKKKRVVQSGLSVVMPVGGQSS

である。

【0285】

したがって、マウスおよびその後のヒトにおいて試験対象であるワクチン全体は、複合体混合物で構成され、これにおいて、各複合体は、さまざまな実施形態におけるカーゴとして、これらの低分子ペプチドまたはその変形ペプチドを有するとともに、Ag85A99-118に対する確固たるCD4応答およびAg85A70-78に対する確固たるCD8応答を提供する。

【0286】

ヒト用ワクチンのある実施形態では、ワクチンは、第1の領域である、配列番号1~19または多様体またはその一部のいずれかに記載の配列などを含むが、これらに制限されない、ヒトホメオドメインまたは多様体またはその一部を、かかる第1の領域と非人工的には会合していない第2の領域に結合させて構成され、これにおいて、前記第2の領域が、ある実施形態では、Ag85A338-アミノ酸ペプチド全体、または適切なヒト被検者において免疫応答を引き起こすことが示された、Ag85Aの1以上の特異的HLA拘束エピトープのようなAg85AのHLA拘束エピトープである(表3を参照のこと)。Ag85Aペプチド、またはそのヒトエピトープを、上記のように第1の領域に連結させてよい。別の実施形態では、HLAクラスIおよびクラスIIのゲノタイプが異なる被検者に対し単一ワクチン構成体を提供するため、Ag85A全体配列は第1の領域に連結している。Ag85A配列は:

MQLVDRVRGA VTGMSRRLVV GAVGAALVSG LVGAVGG
TAT AGAFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGG
ANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS
VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSE
ELPG WLQANRHVKP TGSAAVVGLSM AASSALT LAI YH
PQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS
S DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNK GKL IANNTRV WVYCG
NGKPS DLGGNNLPK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG G
GHNGVFDFFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGAT
PN TGPAPQGA:

(配列番号106)である。

【0287】

ここで、太字で示した長い配列領域および下線上のフォントはシグナルペプチドであり、成熟したAg85A配列が作製されると開裂する(残り296アミノ酸ペプチド)。フィブロネクチン結合ドメインは太字で示し、その直下に斜体で示し、その下の太字に下線を引いた斜体フォントの3アミノ酸は触媒ドメインにある。

【0288】

ある実施形態では、第2の領域のAg85Aのアミノ酸配列(シグナルペプチドなし)は:

AFSRPGLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPAL
Y LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPV
GGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSE
ELPG WLQANRHVKP TGSAAVVGLSM AASSALT LAI YH
PQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWG

P K E D P A W Q R N D P L L N V G K L I A N N T R V W V Y C G N G K P S
D L G G N N L P A K F L E G F V R T S N I K F Q D A Y N A G G G H N G V F
D F P D S G T H S W E Y W G A Q L N A M K P D L Q R A L G A T P N T G P
A P Q G A

と考えられる。このA g 8 5 Aカーゴペプチドの配列番号（配列番号72）を表3に示すが、それとともに、A g 8 5 Aカーゴペプチドまたは変形ペプチドが複合体もしくは融合タンパク質の第2の領域を含んでいる、数ある可能な実施形態のうちの2形態、すなわち、第1の領域にH O X C 1 2（配列番号73）配列またはH O X D 1 2（配列番号74）配列を含有するものを示す。分子生物学／生物工学技術分野の当業者であれば、表3に示すこれらおよび他のあらゆる配列の多数の変形が本明細書に開示の実施形態の範囲に入ることを理解されるであろう。

10

【0289】

ワクチンで誘導された免疫応答の測定. アデノウイルスベクターA g 8 5 Aワクチンに対する免疫応答を第I相臨床試験で測定するため、特異抗体とのインビトロ全血培養およびI型サイトカイン応答の測定を使用し、成功した（Smaill et.al. A Human Type 5 Adenovirus-Based Tuberculosis Vaccine Induces Robust T Cell Responses in Humans Despite Preexisting Anti-Adenovirus Immunity. Sci. Transl. Med. 5, 205: 1-11, 2013）。この手法を使用して、C P P系A g 8 5 Aエピトープワクチン混合物に対するヒトの免疫応答を測定できる。マウスモデルにおいて、同様の方法を使用することができ、処置後の秘蔵リンパ球培養およびB a l b / cマウスにおけるサイトカイン応答を記載のエピトープを用いて行う。

20

【0290】

特異抗原エピトープに対して反応性のC D 4 T細胞数をI F N - γ E L I S P O Tアッセイで定量化することができ、また、C D 4およびC D 8のT細胞応答は、細胞内のサイトカイン染色法により測定でき、末梢血リンパ球培養でのT細胞サブタイプ分類もできる（Smaill et.al.2013）。

【0291】

実施例7

ヒト由来のC P P構造には、H O X D 1 2ホメオドメイン、H O X C 1 2ホメオドメイン、または表3に記載の構造（配列番号1～19）のような他の第1の領域の構造を含むことができる第1の領域が含まれるが、これらに制限されない。第1の領域を第2の領域に結合させ、第1の領域に、疾患状態で異常発現の可能性のある細胞内および／または核内の標的まで「カーゴ（積み荷）」を運ばせるように使用することができる。このような標的には、遺伝子、メッセンジャーRNAおよびm i RNAなどの核酸構造が含まれ得る。ここで、DNA、RNA、LNA、PNA、 γ PNA、他の標準的もしくは修飾を受けた核酸またはこれらの構成要素の組み合わせを設計して、これらの細胞内および／または核内の標的に結合し、疾患状態の異常な発現または活性化特性を抑制することができる。表4はヌクレオチド配列を示し、以下に3実施例を記載する。

30

【0292】

【表 5】

表 4：ヌクレオチド配列同一性

配列 番 号.	識別子	ヌクレオチド配列
75	カーゴが結合する miRNA132 の標的配列	5' -UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG-3'
76	miRNA21 に結合するカーゴ 配列	5' -TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'
77	カーゴが結合する miRNA21 の標的配列	5' - TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'
78	miRNA132 に結合するカーゴ 配列	5' -CGACCATGGCTGTAGACTGTTA-3'
79	DYRK1b に結合するカーゴ配 列	5' -GTGGTGAAAGCCTATGATCAT-3'

【0293】

R a s 経路への影響：1 以上の実施形態では、第 2 の領域のカーゴは m i R N A 1 3 2 標的配列に結合し R a s 経路に影響を及ぼす。

【0294】

R a s 経路は多くの種類の癌で異常発現しており、経路に影響を与える構成体なら経路依存性の腫瘍の増殖を抑えられると考えられる。診断テストを行えば、この治療に反応する可能性が高いであろう腫瘍のある患者が同定されるであろう。活性化した R a s 経路を有すると既知である腫瘍細胞株を使用して、以下に記載の R a s 阻害構成体の生物学的活性を示すことができる。それらの構成体により、インビトロでのこれらの腫瘍細胞の増殖が抑えられ、全身処置後にこれらの細胞を使用する異種移植マウスモデルで腫瘍の増殖が抑えられる。

【0295】

ある実施形態では、H O X C 1 2 アミノ酸配列の第 1 の領域は配列番号 1：
S R K K R K P Y S K L Q L A E L E G E F L V N E F I T R Q R R R E L S D R L N L
S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R L L
である。別の実施形態では、H O X D 1 2 アミノ酸配列の第 1 の領域は配列番号 2：
A R K K R K P Y T K Q Q I A E L E N E F L V N E F I N R Q K R K E L S N R L N L
S D Q Q V K I W F Q N R R M K K K R V V
である。

【0296】

別の実施形態では、第 2 の領域のカーゴは、例えば、核酸配列番号 7 6（表 4）（またはその多様体）であり得る。

【0297】

5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' さらに別の実施形態では、例えば、完全な複合体は配列番号1および76を含む。

【0298】

多くの癌における腫瘍抑制因子の経路への影響：第2の領域のカーゴは、miRNA 21 標的配列に結合し、多くの種類の癌に見られる腫瘍抑制因子の経路に影響を及ぼす。上記のRas経路の実施例同様、さまざまな実施形態において、第1の領域のホメオドメイン配列は、例えば、HOXC12（配列番号1）またはHOXD12（配列番号2）（表3を参照のこと）であり得る。1以上の実施形態では、複合体の第2の領域のカーゴはmiRNA 21 標的配列に結合し、この配列には配列番号77（表4）、またはそれらの任意の多様体がふくまれるが、これらに限定されない。したがって、ある実施形態では、第2の領域のカーゴ、例えば、5'-CGACCATGGCTGTAGACTGTTA-3'（配列番号78）は、miRNA 21 標的配列、例えば、5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'（配列番号77）に結合して、多くの種類の癌に見られる腫瘍抑制因子の経路に影響を及ぼす。

【0299】

インビトロでのこれらの構成体および異種移植腫瘍マウスモデルの試験で、腫瘍細胞の増殖抑制および腫瘍増殖を測定することにより活性を確認することができる。このmiRNAが異常発現している腫瘍があるとわかった癌患者を治療することで、臨床的利益がもたらされるであろう。ある実施形態では、第2の領域のカーゴ配列（配列番号79）は標的配列DYRK1bに結合する。別の実施形態では、配列番号79の変形配列はDYRK1b、またはその機能的多様体に結合する。

【0300】

遺伝子発現への影響：1以上の実施形態では、第2の領域のカーゴはDYRK1bに結合して遺伝子発現を抑制する。

【0301】

この遺伝子の過剰発現は、肺癌および肝癌など多くの癌に存在する。発現増加をもたらすDYRK1bの変異も、II型糖尿病、中心性肥満および早期の冠動脈疾患、メタボリック症候群のすべての特徴の家族性遺伝に関連している。この経路が、一般母集団におけるII型糖尿病および肥満の病因に寄与していると考えられる。そのため、以下に記載するようなDYRK1b阻害剤による全身治療は、DYRK1bを異常に高発現する癌のほか、II型糖尿病およびメタボリック症候群の他の特徴を発症している患者においても有効となるであろう。特に、過剰発現をもたらすDYRK1bの変異が同定された患者では有効であろう。前述したRas経路および腫瘍抑制因子の経路の実施例同様、さまざまな実施形態で、第1の領域のホメオドメイン配列は、例えば、HOXC12（配列番号1）またはHOXD12（配列番号2）であり得る（表3を参照のこと）。ある実施形態では、配列5'-GTGGTGAAAGCCTATGATCAT-3'（配列番号79、表4を参照のこと）またはその変形配列はDYRK1bに結合する。別の実施形態では、配列番号79の変形配列はDYRK1b、またはその機能的変形配列に結合する。

【0302】

上記実施例に記載の試験で報告した特定の群間比較では、有意性を $p < 0.05$ で試験した。

【0303】

以上の記載より、本明細書では具体的な実施形態が説明を目的として記載されているが、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなくさまざまな修正が可能であることは認識されよう。したがって、本開示は添付の請求の範囲に定める場合を除き制限されるものではない。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

（構成1）

ホメオドメイン構造を含み、配列番号1～19に記載のいずれか1つのポリペプチド配列またはその多様体を有する第1の領域、および

前記第 1 の領域に非人工的には会合していない、機能性または調節性のポリペプチドもしくはタンパク質を含む第 2 の領域、を含む複合体。

(構成 2)

H O X D 1 2 ホメオドメインまたは H O X C 1 2 ホメオドメインを少なくとも 1 つ含む第 1 の領域、および

前記第 1 の領域に非人工的には会合していない、機能性または調節性のポリペプチドもしくはタンパク質を含む第 2 の領域、を含む複合体。

(構成 3)

前記第 2 の領域が、N E M O 結合ドメイン、P C 1 C T T 由来の融合タンパク質、先天的な酵素欠損を有する被検者の酵素機能を回復させる酵素、R P E 6 5 遺伝子産物、ジンクフィンガーペプチド、A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチド、または A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチドの少なくとも 1 つを含む、構成 1 または構成 2 に記載の複合体。

(構成 4)

前記 N E M O 結合ドメインが、配列番号 2 0 に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 5)

前記 P C 1 C T T 由来の融合タンパク質が、配列番号 2 3 または 2 6 の少なくとも 1 つに記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 6)

先天的な酵素欠損を有する被検者の酵素機能を回復させる酵素が、配列番号 3 0、4 5、もしくは 4 8 の少なくとも 1 つのポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 7)

前記 R P E 6 5 遺伝子産物が、少なくとも配列番号 3 3 またはその多様体を含むポリペプチド配列を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 8)

前記ジンクフィンガーペプチド配列が、配列番号 3 6、2 9、もしくは 4 2 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む、構成 3 に記載の複合体。

(構成 9)

前記 A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチドが、配列番号 5 1、5 4、5 7、もしくは 6 0 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む配列を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 1 0)

前記 A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチドが、配列番号 6 3、6 6、もしくは 6 9 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む配列を有する、構成 3 に記載の複合体。

(構成 1 1)

前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域の C 末端に結合している、構成 1 または構成 2 に記載の複合体。

(構成 1 2)

前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域の N 末端に結合している、構成 1 または構成 2 に記載の複合体。

(構成 1 3)

融合タンパク質の形態にある、構成 1 および構成 2 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 1 4)

前記第 2 の領域が、細胞内標的および／または核内標的と相互作用する、構成 1 および構成 2 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 1 5)

前記第 2 の領域と前記細胞内標的および／または前記核内標的との相互作用が、N F - κ B 活性化、ぶどう膜炎、多発性嚢胞腎変異を有する尿細管細胞の P C 1 転写因子活性、G C a s e のゴーシェ病変異を有する細胞のグルコセレブロシダーゼ基質、ハーラー症候

10

20

30

40

50

群またはハンター症候群被検者のグリコサミノグリカン、網膜グアニル酸シクラーゼが欠損している網膜細胞の網膜グアニル酸シクラーゼ基質、ハンチントン舞踏病変異を有する細胞の変異ハンチンチン遺伝子の転写調節、および、感染症に暴露されている被検者の結核を予防するための結核ワクチンのようなワクチン実施形態において有効な免疫応答を誘発するための、抗原提示細胞の細胞質内への抗原エピトープの送達、の1つ以上に影響を与える、構成14に記載の複合体。

(構成16)

前記第2の領域が、配列番号23もしくは26またはその多様体を含むポリペプチド配列を有し、かつ、前記複合体が非競合的V2受容体拮抗因子をさらに含む、構成1または構成2いずれかに記載の複合体。

10

(構成17)

前記第2の領域が、配列番号20、23、26、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、および72からなる群から選択されるポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成1または構成2に記載の複合体。

(構成18)

前記第1および第2の領域間にリンカー配列をさらに含む、構成1または構成2に記載の複合体。

(構成19)

前記第1および第2の領域の組み合わせが、配列番号21、22、24、25、27、28、31、32、34、35、37、38、40、41、43、44、46、47、49、並びに50、52、53、55、56、58、59、61、62、64、65、67、68、70、71、73および74からなる群から選択されるポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成1に記載の複合体。

20

(構成20)

前記配列の開始因子メチオニン残基は、活性剤および／または治療剤として使用する前に除去される、構成19に記載の複合体。

(構成21)

前記第1および第2の領域の組み合わせが、ホメオドメイン構造および少なくとも1つのNEMO結合ドメイン、PC1 CTT由来の融合タンパク質、先天的な酵素欠損を有する被検者の酵素機能を回復させる酵素、RPE65遺伝子産物、ジンクフィンガーペプチド、Ag85A99-118エピトープペプチド、並びにAg85A70-78エピトープペプチドを含む配列を有する、構成1に記載の複合体。

30

(構成22)

前記第2の領域が、細胞内標的および／または核内標的と相互作用する、構成21に記載の複合体。

(構成23)

前記第2の領域と細胞内標的および／または核内標的との相互作用が、NF-κB活性化、ぶどう膜炎、多発性嚢胞腎変異を有する尿細管細胞のPC1転写因子活性、GCASEのゴーシェ病変異を有する細胞のグルコセレブロシダーゼ基質、ハーラー症候群またはハンター症候群被検者のグリコサミノグリカン、網膜グアニル酸シクラーゼが欠損している網膜細胞の網膜グアニル酸シクラーゼ基質、ハンチントン舞踏病変異を有する細胞の変異ハンチンチン遺伝子の転写調節、および、例えば、感染症に暴露されている被検者の結核を予防するための結核ワクチン内のようにワクチン活性成分として有効な免疫応答を誘発するための、抗原提示細胞の細胞質内への抗原エピトープの送達、の1以上に影響を与える、構成22に記載の複合体。

40

(構成24)

前記第1および第2の領域間にリンカー配列をさらに含む、構成19または構成21に記載の複合体。

(構成25)

構成1に記載の複合体および薬理学的に許容される担体を含む組成物。

50

(構成 2 6)

構成 2 に記載の複合体および薬理学的に許容される担体を含む組成物。

(構成 2 7)

前記組成物が、吸入可能な組成物、局所用または注射用の点眼製剤他の眼用組成物、浣腸剤、外用組成物、または持続的放出のための注射可能なインプラントなどの注射可能な組成物の形態である、構成 2 5 または構成 2 4 に記載の組成物。

(構成 2 8)

製剤で被検者に投与した場合に、前記複合体が中枢神経系に侵入する、構成 1 または構成 2 に記載の複合体。

(構成 2 9)

製剤で被検者に投与した場合に、前記複合体が、前記第 1 の領域に結合させない場合の前記第 2 の領域によって誘発される望ましくない免疫応答よりも、前記被検者の望ましくない免疫応答の抑制を誘導する、構成 1 または構成 2 に記載の複合体。

(構成 3 0)

構成 1 または構成 2 に記載の複合体を含む製剤を前記被検者に投与することを含み、これにおいて、前記複合体が被検者の前記中枢神経系に侵入する、被検者の状態の治療方法。

(構成 3 1)

構成 2 1 に記載の複合体を含む製剤を前記被検者に投与することを含み、これにおいて、前記複合体が前記被検者の前記中枢神経系に侵入する、被検者の状態の治療方法。

(構成 3 2)

構成 1 または構成 2 に記載の複合体を含む製剤を前記被検者に投与することを含み、これにおいて、前記複合体は、(a) ペプチド暴露の有意な低下がないこと、および (b) 免疫介在性の有害な臨床事象の発生率に有意な増加がないこと、の少なくとも 1 つが見られるよう、抗原ペプチドに対する被検者の免疫応答を予防または改善する、被検者の状態の治療方法。

(構成 3 3)

構成 1 または構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 1 の領域が N E M O 結合ドメインに結合している、被検者のドライアイの治療方法。

(構成 3 4)

前記 N E M O 結合ドメインが、配列番号 2 0 に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 3 3 に記載の方法。

(構成 3 5)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が N E M O 結合ドメインである、被検者の自己免疫および炎症関連の脱毛の治療方法。

(構成 3 6)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が N E M O 結合ドメインである、被検者の自己免疫および炎症関連の脱毛の治療方法。

(構成 3 7)

前記 N E M O 結合ドメインが、配列番号 2 0 に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 3 5 または構成 3 6 に記載の方法。

(構成 3 8)

構成 1 に記載の複合体を含む吸入可能な製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が N E M O 結合ドメインである、被検者の炎症性気道疾患の治療方法。

(構成 3 9)

構成 2 に記載の複合体を含む吸入可能な製剤を被検者に投与することを含み、これにお

10

20

30

40

50

いて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者の炎症性気道疾患の治療方法。

(構成40)

前記炎症性気道疾患は慢性閉塞性肺疾患である、構成38または構成39に記載の方法。

(構成41)

前記N E M O結合ドメインが配列番号20に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成38に記載の方法。

(構成42)

構成1に記載の複合体を含む浣腸製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者の結腸直腸炎症性腸疾患の治療方法。

10

(構成43)

構成2に記載の複合体を含む浣腸製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者の結腸直腸炎症性腸疾患の治療方法。

(構成44)

前記N E M O結合ドメインが、配列番号20に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成42または構成43に記載の方法。

(構成45)

20

構成1に記載の複合体を含む全身投与用製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者の状態の治療方法。

(構成46)

構成2に記載の複合体を含む全身投与用製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者の状態の治療方法。

(構成47)

前記状態が、不安定狭心症、急性心筋梗塞および急性脳卒中の少なくとも1つである、構成45または構成46に記載の方法。

(構成48)

前記N E M O結合ドメインが、配列番号20に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成45または構成46に記載の方法。

30

(構成49)

構成1に記載の複合体を含む全身投与用製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者における一過性の虚血の後の虚血再灌流傷害の治療方法。

(構成50)

構成2に記載の複合体を含む全身投与用製剤を投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がN E M O結合ドメインである、被検者における一過性の虚血の後の虚血再灌流傷害の治療方法。

(構成51)

40

前記虚血再灌流傷害が脳、腎臓または心臓にある、構成49または構成50に記載の方法。

(構成52)

前記N E M O結合ドメインが、配列番号20に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成49または構成50に記載の方法。

(構成53)

構成1に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域が、P C 1 C T T由来の融合タンパク質、P C 1 C T T由来のp 2 0 0 ペプチドまたはP C 1 C T T由来のp 2 1 ペプチドである、被検者の多発性嚢胞腎の治療方法。

50

(構成 5 4)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が、P C 1 C T T 由来の融合タンパク質、P C 1 C T T 由来の p 2 0 0 ペプチドまたは P C 1 C T T 由来の p 2 1 ペプチドである、被検者の多発性嚢胞腎の治療方法。

(構成 5 5)

第 2 の領域が、配列番号 2 3 または 2 6 の少なくとも 1 つに記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 5 3 または構成 5 4 に記載の方法。

(構成 5 6)

複合体が、集合管細胞の腎嚢胞を標的にするために、さらに非競合的 V 2 受容体拮抗因子に結合している、構成 5 3 または構成 5 4 に記載の方法。

10

(構成 5 7)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記複合体の前記第 2 の領域が、先天的な酵素欠損を有する被検者の酵素機能を回復させる酵素を含む、被検者のリソソーム蓄積症の治療方法。

(構成 5 8)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記複合体の前記第 2 の領域が、先天的な酵素欠損を有する被検者の酵素機能を回復させる酵素を含む、被検者のリソソーム蓄積症の治療方法。

(構成 5 9)

酵素が、グルコセレブロシダーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、およびイズロニデート (iduronidate) - 2 - スルファターゼからなる群から選択される、構成 5 7 または構成 5 8 に記載の方法。

20

(構成 6 0)

酵素が、配列番号 3 0、4 5、もしくは 4 8 の少なくとも 1 つに記載のポリペプチド配列またはその多様体を含む、構成 5 7 または構成 5 8 に記載の方法。

(構成 6 1)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が R P E 6 5 遺伝子産物を含む、被検者のレーバー・コンジェンティタル黒内障 (Leber Congenital Amourosis) 1 型の治療方法。

30

(構成 6 2)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が R P E 6 5 遺伝子産物を含む、被検者のレーバー・コンジェンティタル黒内障 (Leber Congenital Amourosis) 1 型の治療方法。

(構成 6 3)

R P E 6 5 遺伝子産物が、配列番号 3 3 に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 6 1 または構成 6 2 に記載の方法。

(構成 6 4)

構成 1 に記載の複合体を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域がジンクフィンガーペプチドを含む、被検者ハンチントン舞蹈病の治療方法。

40

(構成 6 5)

構成 2 に記載の複合体を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域がジンクフィンガーペプチドを含む、被検者ハンチントン舞蹈病の治療方法。

(構成 6 6)

前記ジンクフィンガーペプチド配列が、配列番号 3 6、2 9、もしくは 4 2 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む、構成 6 4 または構成 6 5 に記載の方法。

(構成 6 7)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチドを含む、被検者の結核の治療方法。

50

(構成 68)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチドを含む、被検者の結核の治療方法。

(構成 69)

前記 A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチド配列が、配列番号 5 1、5 4、5 7、もしくは 6 0 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む、構成 6 7 または構成 6 8 に記載の方法。

(構成 70)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチドを含む、被検者の結核の治療方法。

(構成 71)

構成 2 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記第 2 の領域が A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチドを含む、被検者の結核の治療方法。

(構成 72)

前記 A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチド配列が、配列番号 6 3、6 6、もしくは 6 9 またはその多様体を少なくとも 1 つ含む、構成 7 0 または構成 7 1 に記載の方法。

(構成 73)

複数工程を含む方法により調製される複合体であって、
構成 1 に記載の複合体をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、その宿主細胞内に前記複合体が発現される条件下で培養し、
前記複合体をアフィニティー精製により回収する、方法で調整される複合体。

(構成 74)

ホメオドメイン構造を含む第 1 の領域、および
第 1 の領域に非人工的には会合していない、機能性もしくは調節性の核酸またはペプチド核酸を含む第 2 の領域、を含む複合体。

(構成 75)

前記第 1 の領域が H O X D 1 2 ホメオドメインである、構成 7 4 に記載の複合体。

(構成 76)

前記第 1 の領域が H O X C 1 2 ホメオドメインである、構成 7 4 に記載の複合体。

(構成 77)

配列番号 1 ～ 1 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド配列またはその多様体を有するホメオドメイン構造を含む第 1 の領域、および
前記第 1 の領域に非人工的には会合していない、機能性もしくは調節性の核酸またはペプチド核酸を含む第 2 の領域、を含む複合体。

(構成 78)

前記第 2 の領域が、DNA、RNA、LNA、PNA、 γ PNA、または細胞内での生物学的活性を有する、これらの構成要素の組み合わせを含む、構成 7 4 ～ 7 7 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 79)

前記第 2 の領域が、m i R N A 2 1 または D Y R K 1 b に結合する核酸を含む、構成 7 4 ～ 7 7 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 80)

前記第 2 の領域が、配列番号 7 6、7 8、もしくは 7 9 の少なくとも 1 つに記載のヌクレオチド配列またはその多様体を有する、構成 7 4 ～ 7 8 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 81)

前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域の C 末端に結合している、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

10

20

30

40

50

(構成 8 2)

前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域の N 末端に結合している、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 8 3)

前記第 1 の領域が、前記第 2 の領域にペプチド結合で連結している、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 8 4)

前記第 2 の領域が、前記第 1 の領域に非ペプチド結合を介して結合している、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 8 5)

前記第 2 の領域が細胞内標的および／または核内標的と相互作用する、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 8 6)

前記第 2 の領域が、細胞内標的および／または核内標的との相互作用を、m i R N A または m i R N A を結合するタンパク質複合体との相互作用を介して行う、構成 8 5 に記載の複合体。

(構成 8 7)

前記第 2 の領域が、R a s 経路に影響を与えるために m i R N A 1 3 2 に結合する、核酸または P N A である、構成 8 6 に記載の複合体。

(構成 8 8)

前記第 2 の領域が、配列番号 7 5 に記載の m i R N A スクレオチド配列またはその多様体に安定にハイブリダイズする核酸配列もしくは P N A である、構成 8 6 に記載の複合体。

(構成 8 9)

前記第 2 の領域が、配列番号 7 8 に記載のスクレオチド配列、または、m i R N A 1 3 2 に安定にハイブリダイズする前記配列の一部もしくはその多様体のスクレオチド配列を有する、構成 8 8 に記載の複合体。

(構成 9 0)

前記第 2 の領域が、m i R N A 1 3 2 との相互作用の特異性に基づいて選択される、構成 8 8 に記載の複合体。

(構成 9 1)

前記第 2 の領域が、安定性向上または分解抑制のために修飾スクレオチドで構成される、構成 8 8 に記載の複合体。

(構成 9 2)

前記第 2 の領域が、腫瘍抑制因子の経路または腫瘍増殖に影響を与えるために m i R N A 2 1 に結合する核酸配列もしくは P N A である、構成 8 6 に記載の複合体。

(構成 9 3)

前記第 2 の領域が、配列番号 7 6 に記載のスクレオチド配列またはその多様体を含むか、または配列番号 7 7 に記載のスクレオチド配列またはその多様体に安定にハイブリダイズ可能である、構成 9 2 に記載の複合体。

(構成 9 4)

前記第 1 の領域のホメオドメイン構造が、配列番号 2 に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成 7 4、7 5 および構成 7 7 ～ 9 3 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 9 5)

前記第 2 の領域が、細胞内標的および／または核内標的との相互作用を、スプライシングまたはタンパク質翻訳に影響を与えるためにメッセンジャー R N A との相互作用を介して行う、構成 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 に記載の複合体。

(構成 9 6)

前記第 2 の領域が D Y R K 1 b に結合する、構成 9 5 に記載の複合体。

10

20

30

40

50

(構成 9 7)

前記第 2 の領域が、配列番号 7 9 に記載のヌクレオチド配列またはその多様体を有する、構成 9 6 に記載の複合体。

(構成 9 8)

前記第 1 の領域および前記第 2 の領域が、「クリックケミストリー」を介して結合している、構成 7 4 に記載の複合体。

(構成 9 9)

前記第 2 の領域が P N A を含み、かつ、前記第 1 の領域と前記第 2 の領域とがペプチド結合を介して結合している、構成 7 4 に記載の複合体。

(構成 1 0 0)

構成 7 4 に記載の複合体を含む製剤を患者に投与することを含む、被検者の癌の治療方法。

(構成 1 0 1)

構成 9 5 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者の癌の治療方法。

(構成 1 0 2)

構成 9 6 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者の癌の治療方法。

(構成 1 0 3)

構成 9 7 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者の癌の治療方法。

(構成 1 0 4)

構成 7 4 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者のメタボリック症候群、脂質障害および／または肥満の治療方法。

(構成 1 0 5)

構成 9 5 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者のメタボリック症候群、脂質障害および／または肥満の治療方法。

(構成 1 0 6)

構成 9 6 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者のメタボリック症候群、脂質障害および／または肥満の治療方法。

(構成 1 0 7)

構成 9 7 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含む、被検者のメタボリック症候群、脂質障害または肥満の治療方法。

(構成 1 0 8)

静脈投与用液としての製剤を投与することを含む、構成 1 0 0 に記載の癌の治療方法。

(構成 1 0 9)

持続的放出形態の製剤を投与することを含む、構成 1 0 4 に記載のメタボリック症候群、脂質障害および／または肥満の治療方法。

(構成 1 1 0)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、第 2 の領域が、A g 8 5 A 9 9 - 1 1 8 エピトープペプチドまたは A g 8 5 A 7 0 - 7 8 エピトープペプチドの 1 つの少なくとも一部を含む、被検者の結核の治療方法。

(構成 1 1 1)

構成 1 1 0 に記載の被検者の結核の治療方法であって、前記製剤を、吸入経路、経鼻経路を介して、および／または筋肉内、皮内または皮下の注射により少なくとも 1 日 1 回前記被検者に投与すること、および前記製剤の投与により、結核菌による活発な肺感染症が前記被検者に発症するのを防ぐ防御的免疫応答が引き起こされること、を含む結核の治療方法。

(構成 1 1 2)

構成 1 に記載の複合体を含む製剤を被検者に投与することを含み、これにおいて、前記

10

20

30

40

50

第2の領域が、配列番号51、54、57、60、63、66、69および72の少なくとも1つに記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、被検者の結核の治療方法。

（構成113）

被検者において、ドライアイ、自己免疫関連脱毛、炎症関連脱毛、慢性閉塞性肺疾患、炎症性気道疾患、不安定狭心症、急性心筋梗塞、急性脳卒中、および臓器への虚血再灌流傷害のうち任意の1以上を治療する方法であって、
構成1に記載の複合体を含む製剤を少なくとも1日1回投与することを含み、これにおいて、前記第2の領域がNEMO結合ドメインを含み、
これにおいて、前記製剤の投与により、NF- κ B活性阻害、TNF- α 、IP-10、SAA、IL-6、Kcおよび／またはGM-CSFの血中濃度の低下、並びに／または血中インターロイキン10レベルの上昇がもたらされる、治療方法。

10

（構成114）

前記第2の領域が、配列番号20に記載のポリペプチド配列またはその多様体を有する、構成113に記載の方法。

（構成115）

前記第1の領域が、配列番号1または2に記載の任意のポリペプチド配列またはその多様体を含む、構成113に記載の方法。

（構成116）

前記第1の領域がヒト遺伝子由来のポリペプチド配列を含む、構成1、2、74および77のいずれか1に記載の複合体。

20

（構成117）

前記第2の領域が、ヒト遺伝子またはその多様体に由来するポリペプチド配列を含む、構成116に記載の複合体。

（構成118）

前記第2の領域が、ヒト遺伝子またはその多様体に由来する核酸配列を含む、構成116に記載の複合体。

（構成119）

前記被検者がヒトである、構成30～72および100～115のいずれか1に記載の方法。

30

以上

【図 1】

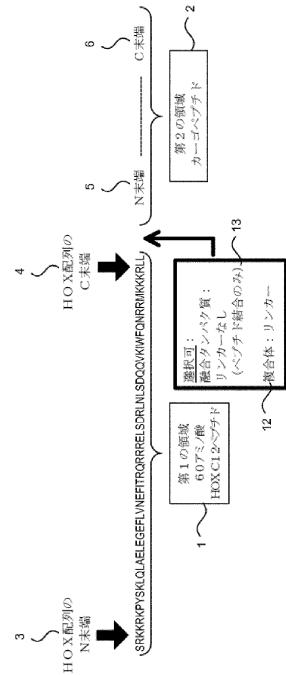


図 1

【図 2】

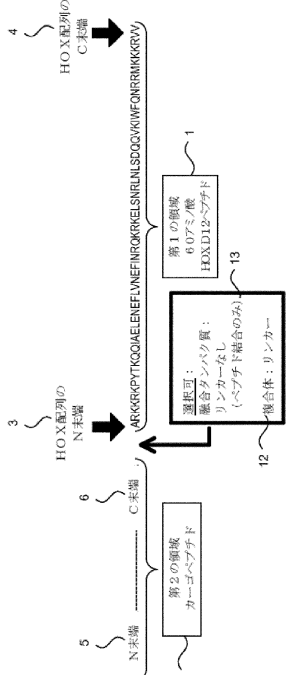


図 2

【図 3 A】

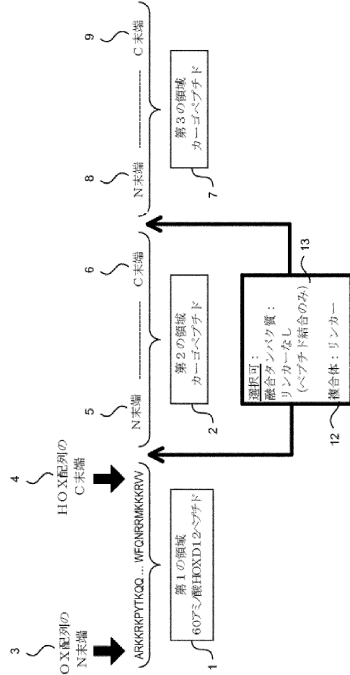


図 3 A

【図 3 B】

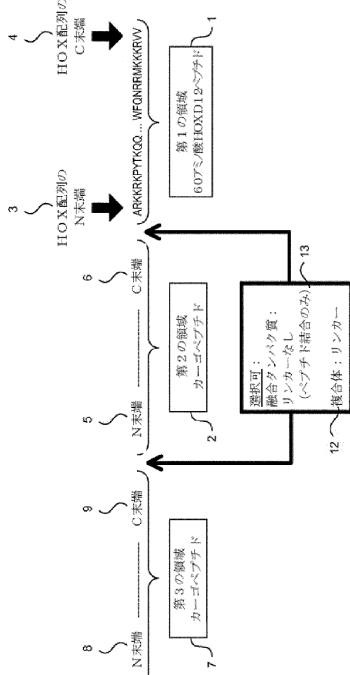


図 3 B

【図 4】

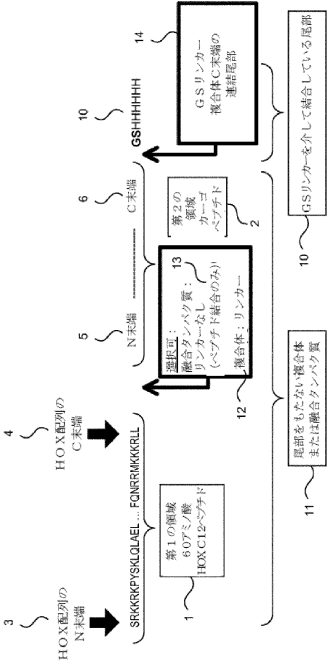


図 4

【図 5】

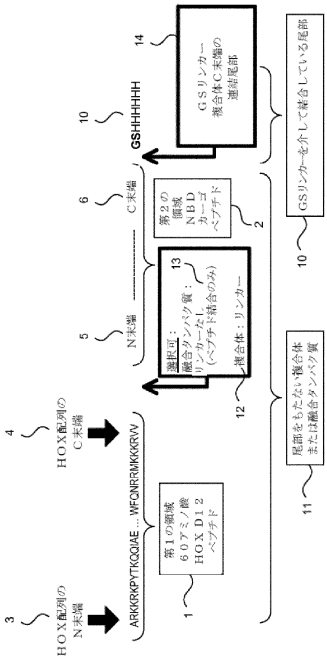


図 5

【図 6】

【図 6】

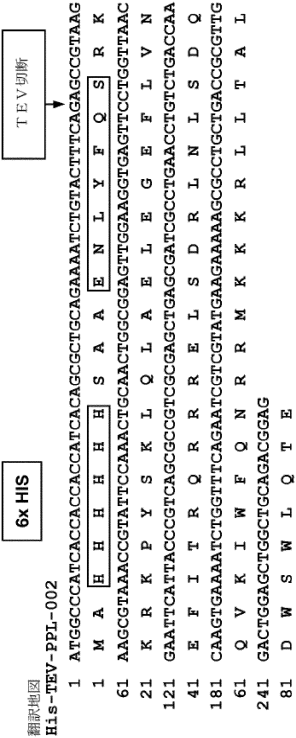


図 6

His-TEV-PPL-002
GCの割合: 51.568%

【図 7】

【図 7】

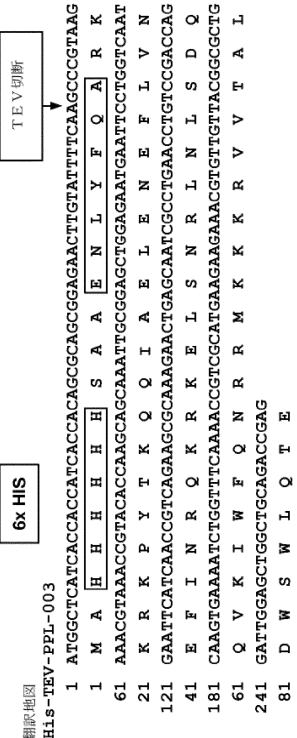
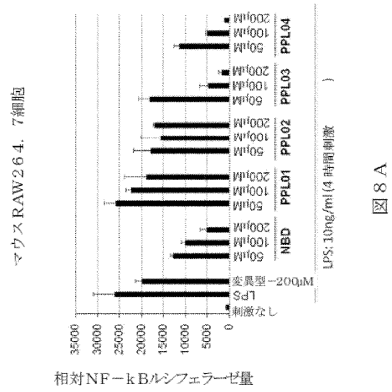


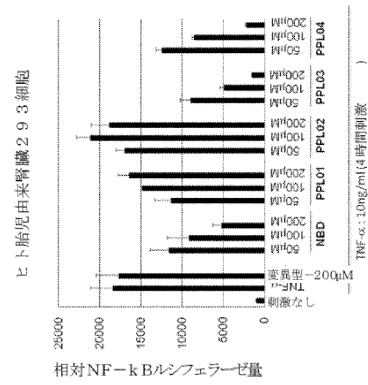
図 7

His-TEV-PPL-003
GCの割合: 48.780%

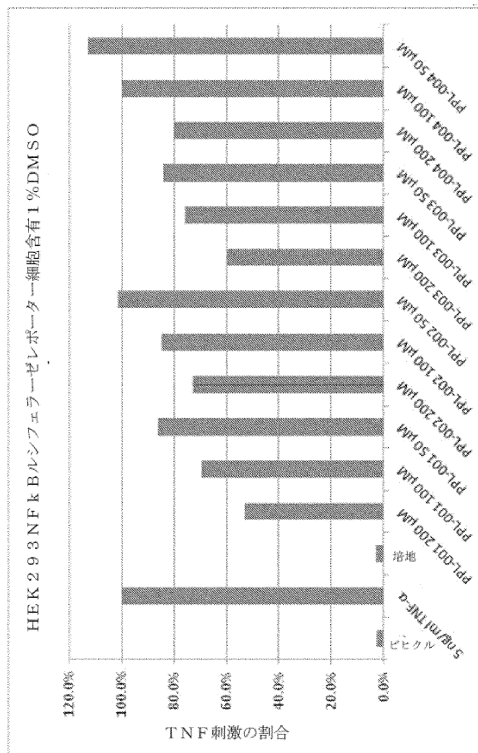
【図 8 A】



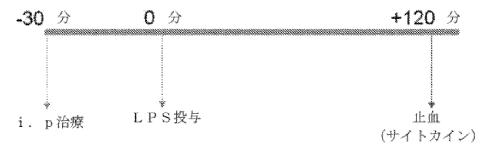
【図 8 B】



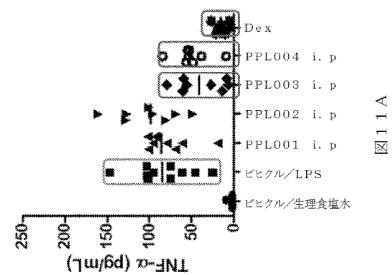
【图 9】



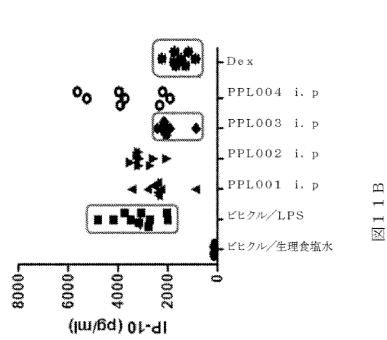
【図 10】



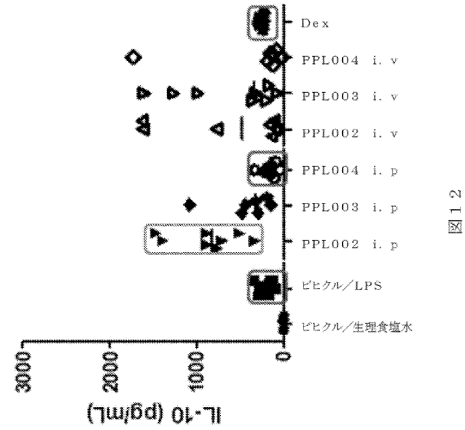
【図 1 1 A】



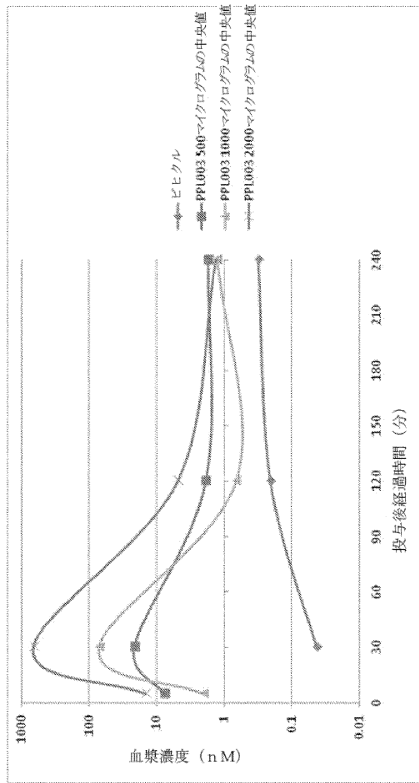
【図 1 1 B】



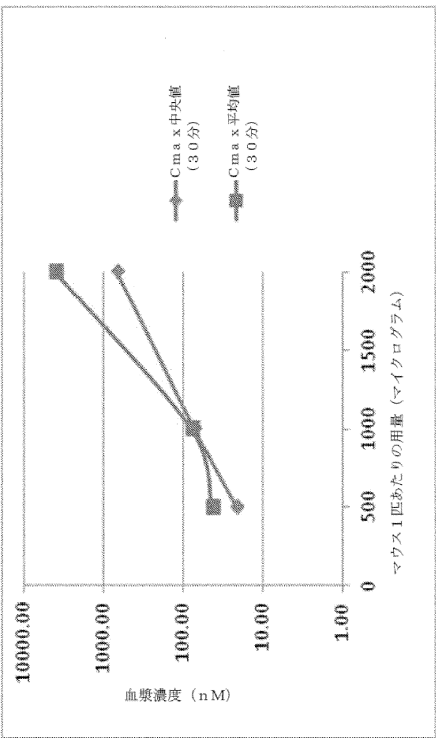
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5 A】

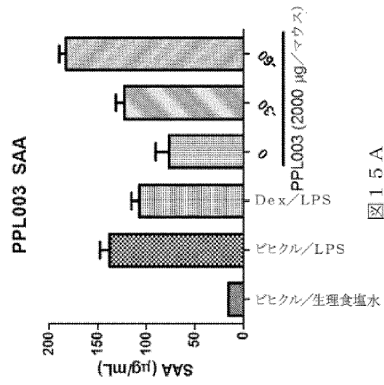


図 1 5 A

【図 1 5 B】

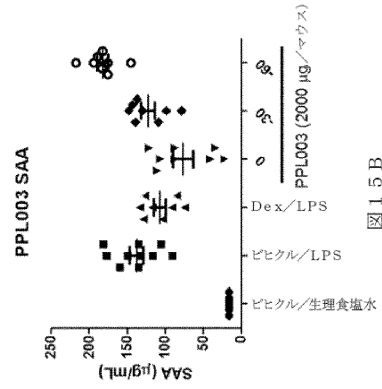


図 1 5 B

【図 1 6 A】

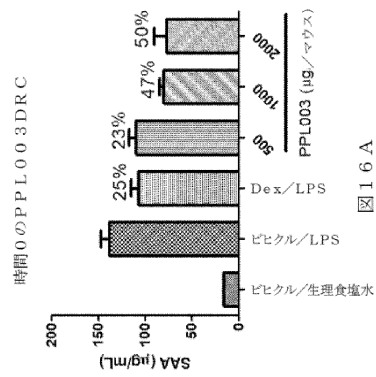


図 1 6 A

【図 1 7 A】

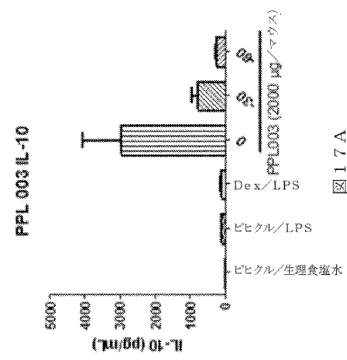


図 1 7 A

【図 1 6 B】

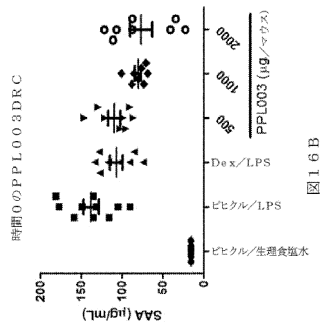
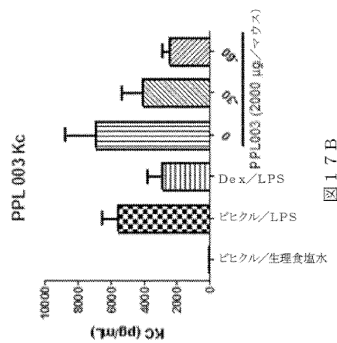
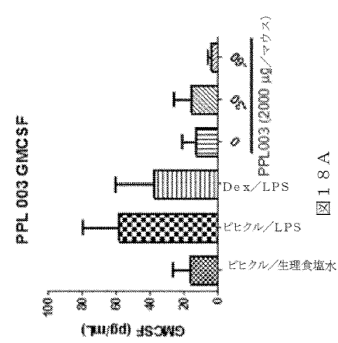


図 1 6 B

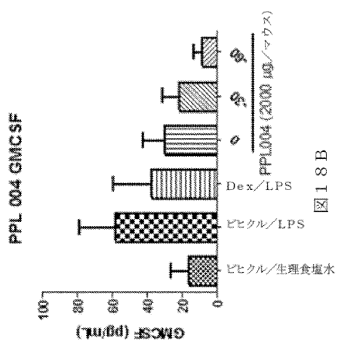
【図 1 7 B】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



【配列表】

0006479777000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K	9/72
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62

Z

(73)特許権者 515343409

ジョン エフ. トンプソン

アメリカ合衆国 ロード アイランド州 0 2 8 8 6 ワーウィック ホールマーク ドライブ
8 0

(73)特許権者 515343410

フランク ダブリュー. マルコウク

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 3 7 8 ストニントン バーネス ロード 1 8

(74)代理人 100097456

弁理士 石川 徹

(72)発明者 ブルース エイチ. リットマン

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 3 7 8 ストニントン プレンティス ウィリアムス
ロード 2 8

(72)発明者 ジョン エフ. トンプソン

アメリカ合衆国 ロード アイランド州 0 2 8 8 6 ワーウィック ホールマーク ドライブ
8 0

(72)発明者 フランク ダブリュー. マルコウク

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 3 7 8 ストニントン バーネス ロード 1 8

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特表2001-514858 (JP, A)

特表2008-508364 (JP, A)

特表2008-535512 (JP, A)

韓国公開特許第10-2011-0026071 (KR, A)

特表2011-519558 (JP, A)

Drug Discovery Today, 2012年, Vol.17, No.15/16, p.850-860

GenBank[online], Accession No. NP_776272, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/27804315?sat=18&satkey=1444461>>, 24-Mar-2012 uploaded, [retrieved on 2018-07-13], Definition : homeobox protein Hox-C12[Homo sapiens]

GenBank[online], Accession No. NP_067016, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/194353946?sat=17&satkey=23265851>>, 07-Jan-2013 uploaded, [retrieved on 2018-07-13], Definiti

on: homeobox protein Hox-D12[Homo sapiens]
GenBank[online], Accession No. NP_115485, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/14149760?sat=18&satkey=23734>>, 18-Apr-2013 uploaded, [retrieved on 2018-07-13], Definition: homeobox protein orthopedia[Homo sapiens]
GenBank[online], Accession No. NP_001182446, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/306922377?sat=17&satkey=23274114>>, 12-Jan-2013 uploaded, [retrieved on 2018-07-13], Definition: T-cell leukemia homeobox protein 1 isoform 2[Homo sapiens]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq